

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044848**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.05

(21) Номер заявки
201990698

(22) Дата подачи заявки
2012.06.01

(51) Int. Cl. *C07K 16/22* (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ К TGF-БЕТА, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 61/493,230

(32) 2011.06.03

(33) US

(43) 2019.12.30

(62) 201391777; 2012.06.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КСОМА ТЕКНОЛОДЖИ ЛТД. (US)

(72) Изобретатель:
**Бединджер Дэниел, Кхан Ширин С.,
Мирза Амер, Нарасимха Аджай Дж.,
Такеути Тосихико (US)**

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

(56) SWATI BISWAS et al., Inhibition of TGF- β with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression, The Journal of Investigation, 2007, Vol. 117, N. 5
US-A1-20060251658
US-A1-20080292638

(57) Изобретение относится к применению антитела, которое связывается с трансформирующим фактором роста бета (TGF β)₁, TGF β ₂ и TGF β ₃, для получения лекарственного средства для лечения колоректального рака, гепатоцеллюлярной карциномы, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака почки, рака легких, фиброзного рака или фибропролиферативных заболеваний.

B1

044848

**044848
B1**

Область техники

Настоящее описание изобретения касается, в основном, материалов и способов для антител, специфических к трансформирующему фактору роста бета (TGF β), включая TGF β 1, TGF β 2 и/или TGF β 3, и использования этих антител в лечении субъектов, имеющих рак, болезненное состояние, нарушение или заболевание глаз, фиброз, включая фиброз глаз или офтальмологические фиброзы, и другие болезненные состояния или нарушения, связанные с экспрессией TGF β .

Предпосылки создания изобретения

Семейство белков трансформирующего фактора роста бета (TGF β) состоит из трех отдельных изоформ, обнаруженных у млекопитающих (TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3). Белки TGF β активируют и регулируют ряд генных реакций, которые влияют на болезненные состояния, включая клеточнопролиферативные, воспалительные и сердечно-сосудистые состояния. TGF β является многофункциональным цитокином, изначально названным по его способности трансформировать нормальные фибробласты в клетки, способные к свободному росту. Молекулы TGF β продуцируются, в первую очередь, гематопоэтическими и опухолевыми клетками и могут регулировать, то есть стимулировать или ингибировать, рост и дифференцировку клеток из многочисленных нормальных и неопластических тканей (Sporn et al., *Science*, 233: 532 (1986)), и стимулировать образование и распространение разных стромальных клеток.

Известно, что TGF β вовлечены во многие пролиферативные и непролиферативные процессы, такие как клеточная пролиферация и дифференцировка, эмбриональное развитие, образование внеклеточного матрикса, костное развитие, заживление ран, гематопоэз и иммунные и воспалительные реакции. Смотри, например, Pircher et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 136: 30-37 (1986); Wakefield et al., *Growth Factors*, 1: 203-218 (1989); Roberts and Sporn, pp 419-472 в *Handbook of Experimental Pharmacology* eds M. B. Sporn & A. B. Roberts (Springer, Heidelberg, 1990); Massague et al., *Annual Rev. Cell Biol.*, 6: 597-646 (1990); Singer and Clark, *New Eng. J. Med.*, 341: 738-745 (1999). Также, TGF β используют в лечении и предотвращении заболеваний кишечной слизистой оболочки (WO 2001/24813). Также известно, что TGF β обладает сильным иммуноугнетающим действием на различные типы иммунологических клеток, включая ингибирование цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) (Ranges et al., *J. Exp. Med.*, 166: 991, 1987), Espevik et al., *J. Immunol.*, 140: 2312, 1988), угнетение лимфопоэза В-клеток и экспрессии каппа легких цепей (Lee et al., *J. Exp. Med.*, 166: 1290, 1987), негативное регулирование гематопоэза (Sing et al., *Blood*, 72: 1504, 1988), понижающую регуляцию экспрессии HLA-DR на опухолевых клетках (Czarnecki et al., *J. Immunol.*, 140: 4217, 1988), и ингибирование пролиферации активированных антигеном В-лимфоцитов в ответ на фактор роста В-клеток (Petit-Koskas et al., *Eur. J. Immunol.*, 18: 111, 1988). Смотри также патент США № 7 527 791.

Антитела к TGF β описаны в патенте США № 7 527 791; 7 927 593; 7 494 651; 7 369 111; 7 151 169; 6 492 497; 6 419 928; 6 090 383; 5 783 185; 5 772 998; 5 571 714 и 7 723 486.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее описание предусматривает способы и композиции для лечения заболеваний или нарушений, связанных с экспрессией TGF β . Описание изобретения предусматривает антитела, которые связывают TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3. Предусматривается, что антитела, описанные в данном документе, могут иметь дифференциальное сродство к любому или всем изоформам TGF β . Кроме того, в данном описании неожиданно обнаружено, что раскрытые TGF β -специфические антитела модулируют иммунные клетки в опухолях (например, проникают в опухоли) и предусматриваются для лечения опухолей, связанных с экспрессией TGF β , а также других состояний или нарушений, связанных с экспрессией TGF β .

В одном аспекте, описание изобретения предусматривает антитело, которое связывает трансформирующий фактор роста бета (TGF β)1, TGF β 2 и TGF β 3, содержащее: (a) аминокислотную последовательность гиперварибельного участка (CDR)1 тяжелой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:13, 19 и 25, или ее вариант, в котором одна или две аминокислоты заменены; (b) аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:14, 20 и 26, из того же варибельного участка тяжелой цепи (a), или ее вариант, в котором одна или две аминокислоты заменены; и (c) аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:15, 21 и 27, из того же варибельного участка тяжелой цепи (a), или ее вариант, в котором одна или две аминокислоты заменены.

В родственном аспекте, описание изобретения предусматривает антитело, которое связывает трансформирующий фактор роста бета (TGF β)1, TGF β 2 и TGF β 3, содержащее: (a) аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:13, 19 и 25, или ее вариант, имеющий с ней по меньшей мере 70% идентичность; (b) аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:14, 20 и 26 из того же варибельного участка тяжелой цепи (a), или ее вариант, имеющий с ней по меньшей мере 70% идентичность; и (c) аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:15, 21 и 27 из того же варибельного участка тяжелой цепи (a), или ее вариант, имеющий с ней по меньшей мере 70% идентичность.

В дополнительном аспекте, описание изобретения предусматривает антитело, которое связывает

трансформирующий фактор роста бета (TGF β)1, TGF β 2 и TGF β 3, содержащее: (а) аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:13, 19 и 25, или ее вариант, имеющий с ней по меньшей мере 70% идентичность; (b) независимо выбранную аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:14, 20 и 26, или ее вариант, имеющий с ней по меньшей мере 70% идентичность; и (с) независимо выбранную аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:15, 21 и 27, или ее вариант, имеющий с ней по меньшей мере 70% идентичность.

В определенных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере две из аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи указаны в табл. 1 или SEQ ID NO:13-15, 19-21 и 25-27. В родственном варианте осуществления, три аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи указаны в табл. 1 или SEQ ID NO:13-15, 19-21 и 25-27.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, предусматривается, что антитело содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85% идентичную аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи, указанной в табл. 1 или SEQ ID NO:2, 6 и 10. В родственном варианте осуществления изобретения, антитело содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи, указанной в табл. 1 или SEQ ID NO:2, 6 и 10.

В еще других вариантах осуществления изобретения, антитело содержит полипептидную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 70% идентичную всем трем HCDR в переменном участке тяжелой цепи, аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, указанные в SEQ ID NO:13-15, 19-21 и 25-27.

В определенных вариантах осуществления изобретения, одна или более каркасных аминокислот тяжелой цепи могут быть заменены соответствующими аминокислотами из другой аминокислотной последовательности человеческого антитела.

Предусматривается, что антитело, описанное в данном документе, дополнительно содержит любую одну аминокислотную последовательность CDR легкой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:16-18, 22-24 и 28-30. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело содержит по меньшей мере две аминокислотные последовательности CDR легкой цепи, указанные в табл. 1 или SEQ ID NO:16-18, 22-24 и 28-30. В других вариантах осуществления изобретения, антитело содержит три аминокислотные последовательности CDR легкой цепи, указанные в табл. 1 или SEQ ID NO:16-18, 22-24 и 28-30.

В другом аспекте, антитело, описанное в данном документе, содержит (а) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:16, 22 и 28, или ее вариант, в котором одна или две аминокислоты заменены; (b) аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:17, 23 и 29, из того же переменного участка легкой цепи (а), или ее вариант, в котором одна или две аминокислоты заменены; и (с) аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:18, 24 и 30, из того же переменного участка легкой цепи (а), или ее вариант, в котором одна или две аминокислоты заменены.

В альтернативных вариантах осуществления изобретения, антитело, предусмотренное данным документом, содержит: (а) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:16, 22 и 28, или ее вариант, в котором одна или две аминокислоты заменены; (b) независимо выбранную аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:17, 23 и 29, или ее вариант, в котором одна или две аминокислоты заменены; и (с) независимо выбранную аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:18, 24 и 30, или ее вариант, в котором одна или две аминокислоты заменены.

В определенных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере две из аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 или CDR3 легкой цепи указаны в табл. 1 или SEQ ID NO:16-18, 22-24 и 28-30.

Дополнительно предусматривается, что антитело, описанное в данном документе, содержит полипептидную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 70% идентичную всем трем LCDR переменного участка легкой цепи, аминокислотным последовательностям LCDR1, LCDR2 и LCDR3, указанным в SEQ ID NO:16-18, 22-24 и 28-30.

В одном варианте осуществления изобретения, антитело, предусмотренное данным документом, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, указанной в табл. 1 или SEQ ID NO:4, 8 и 12. В родственном варианте осуществления изобретения, антитело содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, указанной в табл. 1 или SEQ ID NO:4, 8 и 12. В дополнительном варианте осуществления изобретения, антитело содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, указанной в табл. 1 или SEQ ID NO:4, 8 и 12. В еще другом варианте осуществления изобретения, антитело содержит аминокислотную последовательность переменного участка легкой цепи, указанную в табл. 1 или SEQ ID NO:4, 8 и 12.

В дополнительном варианте осуществления изобретения, антитело, описанное в данном документе, содержит (i) аминокислотную последовательность по меньшей мере на 70% идентичную всем трем LCDR1, LCDR2 и LCDR3, указанным в SEQ ID NO:16-18, 22-24 и 28-30 и (ii) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную всем трем HCDR1, HCDR2 и HCDR3, указанные в SEQ ID NO:13-15, 19-21 и 25-27.

В другом аспекте, описание изобретения предусматривает антитело, которое связывает трансформирующий фактор роста бета (TGF β)1, TGF β 2 и TGF β 3, содержащее переменный участок легкой цепи и/или переменный участок тяжелой цепи, где (a) переменный участок легкой цепи содержит по меньшей мере CDR1, выбранную из SEQ ID NO:16, 22 и 28 или последовательностей по меньшей мере на 80% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO:17, 23 и 29 или последовательностей по меньшей мере на 80% идентичных ей, и/или CDR3, выбранную из SEQ ID NO:18, 24 и 30 или последовательностей по меньшей мере на 80% идентичных ей; и/или где (b) переменный участок тяжелой цепи содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO:13, 19 и 25 или последовательностей по меньшей мере на 80% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO:14, 20 и 26 или последовательностей по меньшей мере на 80% идентичных ей, и/или CDR3, выбранную из SEQ ID NO:15, 21 и 27 или последовательностей по меньшей мере на 80% идентичных ей. В одном варианте осуществления изобретения, переменный участок легкой цепи содержит по меньшей мере CDR1, выбранную из SEQ ID NO:16 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO:17 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранную из SEQ ID NO:18 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей; и/или переменный участок тяжелой цепи содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO:13 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO:14 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранную из SEQ ID NO:15 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей.

В родственном варианте осуществления изобретения, переменный участок легкой цепи содержит по меньшей мере CDR1, выбранную из SEQ ID NO:22 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO:23 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранную из SEQ ID NO:24 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей; и/или переменный участок тяжелой цепи содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO:19 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO:20 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранную из SEQ ID NO:21 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей.

В определенных вариантах осуществления изобретения, переменный участок легкой цепи содержит по меньшей мере CDR1, выбранную из SEQ ID NO:28 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO:29 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранную из SEQ ID NO:30 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей; и/или переменный участок тяжелой цепи содержит CDR1, выбранную из SEQ ID NO:25 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранную из SEQ ID NO:26 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранную из SEQ ID NO:27 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей.

Предусматривается, что процент идентичности любой одной из указанных выше аминокислотных последовательностей антитела может составлять по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность переменному участку тяжелой или легкой цепи или любой из HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3, раскрытых в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело согласно описанию дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, причем константная область тяжелой цепи является модифицированным или немодифицированным IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, его фрагментом или их комбинацией.

В определенных вариантах осуществления изобретения, предусматривается антитело, в котором одна или более каркасных аминокислот легкой цепи заменены соответствующими аминокислотами из другой аминокислотной последовательности человеческого антитела.

В одном аспекте, антитело согласно описанию выбирают из группы, состоящей из XPA.42.089, XPA.42.068 и XPA.42.681. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей XPA.42.089 указаны в SEQ ID NO:6 и 8, соответственно. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей XPA.42.068 указаны в SEQ ID NO:2 и 4, соответственно, а аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей XPA.42.681 указаны в SEQ ID NO:10 и 12, соответственно.

В одном варианте осуществления изобретения, антитело, описанное в данном документе, дополнительно содержит константную область человеческой легкой цепи, присоединенную к указанному переменному участку легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения, константная область легкой цепи является модифицированной или немодифицированной константной областью ламбда лег-

кой цепи, константной областью каппа легкой цепи, их фрагментом или их комбинацией.

В предпочтительном варианте осуществления, описание изобретения предусматривает антитело, специфическое к TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3, с аффинностью Kd 10 М или меньше. В примерах осуществления изобретения, анти-TGF β антитело, описанное в данном документе, связывает по меньшей мере одну изоформу TGF β с аффинностью 10⁻⁶ М, 10⁻⁷ М, 10⁻⁸ М, 10⁻⁹ М или меньше, или необязательно две изоформы TGF β , или все из TGF β 1, 2 или 3 с аффинностью 10⁻⁶ М, 10⁻⁷ М, 10⁻⁸ М, 10⁻⁹ М, 10⁻¹⁰ М, 10⁻¹¹ М, 10⁻¹² М или меньше для одной или более изоформ. В других вариантах осуществления изобретения, антитело, описанное в данном документе, связывает TGF β 1 и TGF β 2 с по меньшей мере 2-50 кратно, 10-100 кратно, 2-кратно, 5-кратно, 10-кратно, 25-кратно, 50-кратно или 100-кратно или на 20-50%, 50-100%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% повышенной аффинностью (например, предпочтительнее связывает TGF β 1 и TGF β 2) по сравнению со связыванием TGF β 3. В качестве альтернативы, антитело, описанное в данном документе, связывает каждую из TGF β -изоформ TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3 с 3-кратной, 5-кратной или 10-кратной аффинностью. В определенных вариантах осуществления изобретения, антитело связывает TGF β 1 и TGF β 2 с большей аффинностью, чем TGF β 3. В определенных вариантах осуществления изобретения, аффинность измеряют с помощью поверхностно-плазмонного резонанса или KINEXA - анализа кинетического исключения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело нейтрализует активность TGF β 1 и TGF β 2 в большей степени, чем TGF β 3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нейтрализация антителом активности TGF β 1 и TGF β 2 является по меньшей мере в 2-50 раз, 10-100 раз, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 25 раз, 50 раз или 100 раз, или на 20-50%, 50-100%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% более сильной, чем нейтрализация TGF β 3. Примеры нейтрализационных анализов, рассмотренные в данном документе, включают анализ вывобождения интерлейкина-11 и анализ пролиферации клеток HT-2, но не ограничиваются ими. К тому же, анализ активности TGF β может быть осуществлен для определения того, ингибирует ли антитело, описанное в данном документе, преимущественно одну изоформу TGF β , включая анализ фосфорилирования pSMAD или анализ связывания rhLAP. В дополнительном варианте осуществления изобретения, антитело имеет более низкую IC50 (то есть, лучшее связывание, большую силу) для TGF β 1 и TGF β 2 по сравнению с TGF β 3.

В другом аспекте, описание изобретения предусматривает молекулу выделенной нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь и/или легкую цепь, как описано в данном документе.

В дополнительном аспекте, описание изобретения предусматривает вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, рассмотренную в данном документе, функционально связанную с управляющей экспрессией последовательностью. Также предполагается клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии или молекулу нуклеиновой кислоты согласно описанию изобретения. В определенных вариантах осуществления, описание изобретения предусматривает клетку-хозяин, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи или легкой цепи, где нуклеиновые кислоты тяжелой цепи и легкой цепи экспрессируются с помощью разных нуклеиновых кислот или на той же нуклеиновой кислоте.

В родственном аспекте, описание изобретения предусматривает способ использования клетки-хозяина, как описано в данном документе, для продуцирования антитела, способ, включающий культивирование клетки-хозяина в подходящих условиях и извлечение указанного антитела. Также предусматривается антитело, полученное с помощью способа, описанного в данном документе.

Описание изобретения дополнительно предусматривает стерильную фармацевтическую композицию, содержащую антитело, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте, описание изобретения предусматривает способ лечения заболевания, болезненного состояния или нарушения, связанного с экспрессией TGF β , включающий этап введения субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, предусмотренных в данном документе. В определенных вариантах осуществления изобретения, заболевание, болезненное состояние или нарушение выбирают из группы, состоящей из рака, глазного (например, окулярного, оптического, офтальмического или офтальмологического) заболевания, состояния или нарушения; болезненного состояния или нарушения, связанного с фиброзом, например, фибропролиферативных заболеваний, состояний или нарушений; или заболеваний, состояний или нарушений, имеющих ассоциированный фиброз.

Фибропролиферативные заболевания состояния или нарушения или заболевания, имеющие ассоциированный фиброз, включают заболевания, которые поражают любой орган или ткань в организме, включая кожу, легкие, почки, сердце, мозг и глаза, но не ограничиваются ими. Фибропролиферативные заболевания состояния или нарушения или заболевания, имеющие ассоциированный фиброз, включают, фиброз легких, идеопатический фиброз легких, перибронхиолярный фиброз, интерстициальный легочный фиброз, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), заболевание малых дыхательных путей (например, обструктивный бронхит), эмфизему, зрелый или острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), острое поражение легких (ALI), фиброз легких из-за инфекционных или токсических

агентов, фиброз почек, гломерулонефрит (GN) всех этиологии, мезангиальнопролиферативный GN, иммунный GN, суставной GN, гломерулосклероз, тубулоинтерстициальное повреждение, почечноинтерстициальный фиброз, почечный фиброз и все причины почечного интерстициального фиброза, почечный фиброз, вызванный осложнениями вследствие приема лекарств, включая лечение циклоспорином реципиентов трансплантатов, ВИЧ-ассоциированную нефропатию, отмирание трансплантатов, диабетическое заболевание почек, диабетическую нефропатию, нефрогенный системный фиброз, сахарный диабет, идиопатический ретроперитонеальный фиброз, склеродерму, фиброз печени, гепатические заболевания, связанные с чрезмерным рубцеванием и прогрессирующим склерозом, цирроз печени всех этиологий, нарушения билиарного дерева, печеночную дисфункцию, свойственную инфекциям, кистозно-фиброзные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, застойную сердечную недостаточность, дилатационную кардиомиопатию, миокардит, васкуляроstenозный фиброз сердца, постинфарктный фиброз сердца, инфаркт миокарда, гипертрофию левого желудочка, веноокклюзионное заболевание, рестеноз, постангиопластический рестеноз, артериовенозную трансплантационную недостаточность, атеросклероз, гипертонию, гипертоническую болезнь сердца, сердечную гипертрофию, гипертрофическую кардиомиопатию, сердечную недостаточность, заболевание аорты, прогрессивный системный склероз; полимиозит; системную красную волчанку; дерматомиозит, фасцит, синдром Рейнольда, ревматоидный артрит, пролиферативную витреоретинопатию, витреоретинопатию любой этиологии, фиброз, связанный с глазной хирургией, лечением глаукомы, реплантацией сетчатки, удалением катаракты, или дренажными процедурами любого вида, рубцеванием в роговице и конъюнктиве, фиброз в роговичном эндотелии, щелочной ожог (например, щелочной ожог роговицы), фиброз капсулы хрусталика после операции на катаракте, чрезмерное рубцевание в тканях вокруг расположенных вне глаз мышц при хирургическом лечении косоглазия, переднюю подкапсулярную катаракту и заднее подкапсулярное помутнение, переднесеgmentарное фиброзное заболевание глаз, фиброз роговичной стромы, фиброз, связанный с помутнением роговицы, фиброз трабекулярной сетки, фиброз, связанный с глаукомой, заднесеgmentарное фиброзное заболевание глаз, фиброваскулярное рубцевание, фиброз в сосудистой или хороидальной васкулатуре глаз, фиброз сетчатки, эпиретинальный фиброз, ретинальный глиоз, субретинальный фиброз, фиброз, связанный с возрастной макулярной дегенерацией, постретинальной хирургией и операцией на глаукоме, тракционное отслоение сетчатки в ассоциации с сужением ткани при диабетической ретинопатии, болезнь Пейрони, системный склероз, постспинальное кордовое повреждение, остеопороз, болезнь Камурати-Энгельманна, болезнь Крона, рубцевание, синдром Марфана, синдром истощения яичников, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, фиброз вследствие хирургических иссечений механической травмы, фиброз, связанный с глазной хирургией, и чрезмерное или гипертрофическое образование рубцов и келоидов на коже вследствие заживления ран, возникших в результате травм и хирургических повреждений, но не ограничиваются ими.

Примеры глазных (например, окулярных, оптических, офтальмических или офтальмологических) заболеваний, состояний или нарушений включают фибропролиферативные нарушения, фиброз глаз, офтальмический фиброз, дисфункцию сетчатки, фиброз, связанный с дисфункцией сетчатки, влажную или сухую макулярную дегенерацию, пролиферативную витреоретинопатию, витреоретинопатию любой этиологии, фиброз, связанный с глазной хирургией, такой как лечение глаукомы, реплантация сетчатки, удаление катаракты, или дренажными процедурами любого вида, рубцевание в роговице и конъюнктиве, фиброз в эндотелии роговицы, щелочной ожог (например, щелочной ожог роговицы), фиброз капсулы хрусталика после операции на катаракте, чрезмерное рубцевание в тканях вокруг расположенных вне глаз мышц при хирургическом лечении косоглазия, переднюю подкапсулярную катаракту и заднее подкапсулярное помутнение, переднесеgmentарное фиброзное заболевание глаз, фиброз роговичной стромы (например, связанный с помутнением роговицы), фиброз трабекулярной сетки (например, связанный с глаукомой), заднесеgmentарное фиброзное заболевание глаз, фиброваскулярное рубцевание (например, в сосудистой или хороидальной васкулатуре глаз), фиброз сетчатки, эпиретинальный фиброз, ретинальный глиоз, субретинальный фиброз (например, связанный с возрастной макулярной дегенерацией), фиброз, связанный с постретинальной хирургией и операцией на глаукоме, тракционное отслоение сетчатки в ассоциации с сужением ткани при диабетической ретинопатии, но не ограничиваются ими.

Примеры фибропролиферативных глазных заболеваний, состояний или нарушений, фиброза глаз, окулярного фиброза или офтальмического фиброза включают пролиферативную витреоретинопатию, витреоретинопатию любой этиологии, фиброз, связанный с дисфункцией сетчатки, фиброз, связанный с влажной или сухой макулярной дегенерацией, фиброз, связанный с глазной хирургией, такой как лечение глаукомы, реплантация сетчатки, удаление катаракты, или дренажными процедурами любого вида, рубцевание в роговице и конъюнктиве, фиброз в эндотелии роговицы, фиброз, связанный со щелочным ожогом, фиброз капсулы хрусталика после операции на катаракте, чрезмерное рубцевание в тканях вокруг расположенных вне глаз мышц при хирургическом лечении косоглазия, переднюю подкапсулярную катаракту и заднее подкапсулярное помутнение, переднесеgmentарное фиброзное заболевание глаз, фиброз роговичной стромы (например, связанный с помутнением роговицы), фиброз трабекулярной сетки (например, связанный с глаукомой), заднесеgmentарное фиброзное заболевание глаз, фиброваскулярное рубцевание (например, в сосудистой или хороидальной васкулатуре глаз), фиброз сетчатки, эпирети-

нальный фиброз, ретинальный глиоз, субретинальный фиброз (например, связанный с возрастной макулярной дегенерацией), фиброз, связанный с постретинальной хирургией и операцией на глаукоме, тракционное отслоение сетчатки в ассоциации с сужением ткани при диабетической ретинопатии, но не ограничиваются ими.

В разных вариантах осуществления изобретения фибропролиферативное глазное заболевание, состояние или нарушение выбирают из группы, состоящей из пролиферативной витреоретинопатии, фиброза, связанного с глазной хирургией, фиброза хрусталика после операции на катаракте, фиброза роговичной стромы и щелочного ожога.

В родственном аспекте, описание изобретения предусматривает способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, предусмотренных в данном документе. В определенных вариантах осуществления изобретения, рак выбирают из группы, состоящей из рака легких, рака простаты, рака молочной железы, гепатоцеллюлярного рака, рака пищевода, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака почек, овариального рака, рака желудка, фиброзного рака, глиомы и меланомы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или фармацевтическая композиция увеличивают количество природных киллерных клеток (NK) в опухоли. В разных вариантах осуществления изобретения, антитело или композиция повышают цитолитическую активность NK-клеток. Например, в разных вариантах осуществления изобретения, антитело или композиция, описанные в данном документе, повышают продуцирование перфорина и гранзима NK-клетками. В одном варианте осуществления изобретения, антитело является ХРА.42.089 или ХРА.42.681.

В разных вариантах осуществления изобретения, антитело или композиция, описанные в данном документе, снижают количество регуляторных Т-клеток в опухоли и/или ингибируют функцию регуляторных Т-клеток. Например, в разных вариантах осуществления изобретения, антитело или композиция, описанные в данном документе, ингибируют способность Т-регуляторов к понижающей регуляции иммунной реакции или к миграции к сайту иммунного ответа.

В разных вариантах осуществления изобретения, антитело или композиция увеличивают количество цитотоксических Т-клеток в опухоли и/или повышают CTL-активность, например, стимулируют, увеличивают или способствуют CTL-активности. Например, в разных вариантах осуществления изобретения, антитело или композиция, описанные в данном документе, увеличивают продуцирование перфорина или гранзима с помощью CTL и повышают цитолитическую активность CTL. В одном варианте осуществления изобретения, антитело является ХРА.42.068, ХРА.42.089 или ХРА.42.681.

В другом варианте осуществления изобретения, антитело или композиция снижают количество стволовых клеток, полученных из моноцитов, (MDSC) в опухоли и/или ингибируют функцию MDSC. Например, в разных вариантах осуществления изобретения, антитело или композиция, описанные в данном документе, ингибируют способность MDSC подавлять иммунную реакцию, ингибировать иммунную супрессивную активность MDSC и/или ингибировать способность MDSC содействовать экспансии и/или функционированию Т-регуляторов. В разных вариантах осуществления изобретения, антитело выбирают из группы, состоящей из ХРА.42.089, ХРА.42.068 и ХРА.42.681.

В разных вариантах осуществления изобретения, антитело снижает количество дендритных клеток (DC) в опухоли и/или ингибирует толерогенную функцию (например, толерогенный эффект) дендритных клеток. Например, в разных вариантах осуществления изобретения, антитело или композиция, описанные в данном документе, снижают толерогенный эффект CD8+дендритных клеток. В одном варианте осуществления изобретения, антитело является ХРА.42.089 или ХРА.42.681.

В другом аспекте, описание изобретения предусматривает способ лечения фиброза, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, предусмотренных в данном документе.

В разных вариантах осуществления изобретения, антитело вводят со вторым агентом. В одном варианте осуществления изобретения, второй агент выбирают из группы, состоящей из деградирующих белков внеклеточного матрикса, противифибротического агента, хирургического лечения, химиотерапии, цитотоксического агента или радиотерапии. Примеры вторых агентов более детально раскрыты в разделе "Подробное описание изобретения".

В разных вариантах осуществления изобретения, терапию используют на периодической основе, например, почасово, суточно, еженедельно, каждые 2 недели, каждые 3 недели, ежемесячно или с более длинным интервалом. В родственном варианте осуществления изобретения, в примерах лечения антитело, раскрытое в данном документе, может вводиться в дозе, приблизительно, 1 мг/день, 5 мг/день, 10 мг/день, 20 мг/день, 50 мг/день, 75 мг/день, 100 мг/день, 150 мг/день, 200 мг/день, 250 мг/день, 500 мг/день или 1000 мг/день. Эти концентрации могут вводиться как в форме однократной дозы, так и в форме многократных доз.

Также предусматривается композиция, содержащая любое из указанных выше антител или композиций согласно описанию изобретения, которые связывают TGF β , или их использование в приготовлении лекарственного средства для лечения любого из заболеваний, описанных в данном документе, свя-

занного с экспрессией TGF β . Также предусматриваются шприцы, например, разового применения или предварительно заполненные шприцы, стерильные запечатанные контейнеры, например, ампулы, флаконы, сосуды, и/или наборы или упаковки, содержащие любое из вышеупомянутых антител или композиции, необязательно с подходящей инструкцией по использованию.

Известно, что каждый признак или вариант осуществления, или комбинация, описанные в настоящем документе, не являются ограничивающими, а иллюстрируют примеры любого из аспектов изобретения и, как таковые, подразумевают комбинирование с любым другим признаком или вариантом осуществления, или комбинацией, описанными в данном документе. Например, когда признаки описаны выражением, таким как "один вариант осуществления", "некоторые варианты осуществления", "определенные варианты осуществления", "дополнительный вариант осуществления", "специфические примеры вариантов осуществления" и/или "другой вариант осуществления", то каждый из этих типов осуществлений не является ограничивающим примером признака, который предназначен для комбинирования с любым другим признаком или комбинацией признаков, описанных в данном документе, без указания каждой возможной комбинации. Такие признаки или комбинации признаков используют любой из аспектов изобретения. Когда раскрываются примеры значений, охваченные диапазонами, то любой из этих примеров рассматривается как возможные предельные значения диапазона, предусматриваются любое или все численные значения между такими предельными значениями и предвидятся любая или все комбинации нижних и верхних предельных значений.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлен график, показывающий конкуренцию связывания TGF β 1 с rhLAP антителами к TGF β .

На фиг. 2 показана нейтрализация pSMAD-сигналирования в клетках антителами к TGF β . (A) TGF β 1; (B) TGF β 2; (C) TGF β 3.

На фиг. 3 представлен график, показывающий ингибирование регуляторных T-клеток (Treg) антителами к TGF β .

На фиг. 4 представлен график, показывающий ингибирование опухоли на ксенотрансплантатной мышинной модели антителами к TGF β .

На фиг. 5 представлен график, показывающий ингибирование опухоли на ксенотрансплантатной мышинной модели антителами к TGF β .

На фиг. 6 представлен график, показывающий ингибирование опухоли на изогенной мышинной модели антителами к TGF β .

На фиг. 7 представлен график, показывающий ингибирование опухоли на изогенной мышинной модели антителами к TGF β .

На фиг. 8 представлен график, показывающий ингибирование опухоли на изогенной мышинной модели антителами к TGF β .

На фиг. 9 представлен график, показывающий ингибирование опухоли на изогенной мышинной модели антителами к TGF β .

На фиг. 10 представлен график, показывающий *in vivo* действие антител к TGF β на природные клетки-киллеры в опухолях на изогенной мышинной модели опухоли.

На фиг. 11 представлен график, показывающий *in vivo* действие антител к TGF β на миелоид-производные клетки-супрессоры в опухолях на изогенной мышинной модели.

На фиг. 12 представлен график, показывающий *in vivo* действие антител к TGF β на дендритные клетки в опухолях на изогенной мышинной модели опухоли.

На фиг. 13 представлен график, показывающий *in vivo* действие антител к TGF β на регуляторные T-клетки в опухолях на изогенной мышинной модели опухоли.

На фиг. 14 представлен график, показывающий *in vivo* действие антител к TGF β на цитотоксические T-клетки в опухолях на изогенной мышинной модели опухоли.

На фиг. 15 представлен график, показывающий *in vitro* действие антител к TGF β на цитолитическую активность NK-клеток.

На фиг. 16 представлен график, показывающий действие антител к TGF β на пролиферацию T-клеток.

На фиг. 17 представлен график, показывающий действие антител к TGF β на CTL-активацию, оцененное по экспрессии гранзима B (GzmB) (Фиг. 17A) и перфорина (Фиг. 17B).

На фиг. 18 представлен график, показывающий действие антител к TGF β на уровни мочевинового азота в сыворотке крови (BUN) у обработанных CsA животных и контрольных животных, получавших антитела к TGF β .

На фиг. 19 представлен график, показывающий действие антител к TGF β на накопление альбумина, который является характеристикой гломерулярной дисфункции, в больной почке, в моче обработанных CsA животных и контрольных животных, получавших антитела к TGF β .

На фиг. 20 представлен график, показывающий действие антител к TGF β на уровни в моче коллагена.

на IV типа, который отражает степень отложения ECM и фиброза в почках, в моче обработанных CsA животных и контрольных животных, получавших антитела к TGF β .

На фиг. 21 представлен график, показывающий действие антител к TGF β на экспрессию генов, вовлеченных в фиброз, как определено количественным RT-PCR, проведенным на почечных тканях. Действие на экспрессию TGF- β 1 (Фиг. 21A) и коллаген III типа (Фиг. 21B) оценивали у обработанных CsA животных и контрольных животных, получавших антитела к TGF β .

На фиг. 22 представлен график, показывающий действие антител к TGF β на повышение pSMAD2 в клетках пигментного эпителия сетчатки (RPE) после введения TGF β 1.

Подробное описание изобретения

Настоящее описание изобретения предусматривает терапевтические средства для лечения болезненных состояний или нарушений, связанных с экспрессией TGF β , например, рака и фиброза. Настоящее описание изобретения предусматривает молекулы или агенты, которые взаимодействуют с TGF β и ингибируют одно или более его функциональных действий, таких как, например, передача сигнала посредством связывания партнеров TGF β . Композиции, описанные в данном документе, преимущественно обладают способностью модулировать иммунную активность клеток в опухолях, тем самым обеспечивая, в одном аспекте, способ лечения рака путем воздействия на клеточную популяцию, что прямо или опосредованно влияет на рост опухоли.

Для более полного понимания описания изобретения объяснены несколько определений.

Как использовано в данном документе, "мишень" или "антиген-мишень" относится к любой или всем молекулам TGF- β , включая TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3.

Как использовано в данном документе, "TGF β " относится к любой одной или более изоформам TGF β , включая TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3, или их вариантам. Таким же образом, термин "рецептор TGF β ," если не указано иное, относится к любому рецептору, который связывает по меньшей мере одну изоформу TGF β .

Как использовано в данном документе, "желательная биологическая активность" антитела против мишени представляет собой способность связывать TGF β и ингибировать одно или более его функциональных действий.

Как использовано в данном документе, "болезненное состояние" или "нарушение, связанное с экспрессией мишени" представляет собой состояние или нарушение, при котором целевая активность является пагубной и включает заболевания или другие нарушения, при которых высокие уровни мишени, как было доказано, являются ответственными или подозреваются в ответственности за патофизиологию нарушения, или являются фактором, который способствует ухудшению нарушения, а также заболевания и другие нарушения, при которых высокие уровни целевой экспрессии связаны с нежелательными клиническими признаками или симптомами. Такие нарушения можно подтвердить, например, повышением уровней мишени, секретированной на поверхности клеток, и/или повышенной передачей сигналов в пораженных клетках или тканях субъекта, страдающего от нарушения. Повышение уровней мишени можно определить, например, с использованием специфического к мишени антитела, как описано в данном документе.

Примеры заболеваний, состояний или нарушений, связанных с экспрессией TGF β , которые могут лечиться антителом, связывающим TGF β (например, антителами согласно настоящему описанию) включают рак, такой как рак легких, рак простаты, рак молочной железы, гепатоцеллюлярный рак, рак пищевода, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак почек, овариальный рак, рак желудка, фиброзный рак, глиома и меланома, глазные заболевания (например, окулярные, оптические, офтальмические или офтальмологические), состояния или нарушения, болезненные состояния или нарушения, связанные с фиброзом, например, фибропролиферативные заболевания, состояния или нарушения, или заболевания, состояния или нарушения, имеющие сопутствующий фиброз.

Фибропролиферативные заболевания, состояния или нарушения, или болезненные состояния или нарушения, имеющие сопутствующий фиброз, включают заболевания, состояния или нарушения, которые поражают любой орган или ткань в организме, включая кожу, легкие, почки, сердце, мозг и глаза, но не ограничиваются ими. Фибропролиферативные заболевания, состояния или нарушения или болезненные состояния или нарушения, имеющие сопутствующий фиброз, включают фиброз легких, идиопатический фиброз легких, перибронхиолярный фиброз, интерстициальный фиброз легких, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), заболевание малых дыхательных путей (например, обструктивный бронхит), эмфизему, развитой или острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), острое повреждение легких (ALI), фиброз легких, обусловленный инфекционными или токсическими агентами, фиброз почек, гломерулонефрит (GN) всех этиологии, например, мезангиальнопролиферативный GN, иммунный GN и суставной GN, гломерулосклероз, тубулоинтерстициальное повреждение, почечный интерстициальный фиброз, почечный фиброз и все причины почечного интерстициального фиброза, почечный фиброз вызванный осложнениями вследствие приема лекарств, включая циклоспориновую терапию трансплантатных реципиентов, например, лечение циклоспорином, ВИЧ-ассоциированную нефропатию, отмирание трансплантата, диабетическое заболевание почек (например, диабетическую нефропа-

тию), нефрогенный системный фиброз, диабет, идиопатический ретроперитонеальный фиброз, склеродерму, фиброз печени, заболевания печени, связанные с избыточным рубцеванием и прогрессирующим склерозом, включая цирроз печени всех этиологий, нарушения билиарного древа, нарушение функции печени, приписываемое инфекциям, кистозно-фиброзные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, такие как застойная сердечная недостаточность; дилатационная кардиомиопатия, миокардит, васкулярный стеноз, кардиальный фиброз (например, послеинфарктный кардиальный фиброз), инфаркт миокарда, гипертрофия левого желудочка, веноокклюзионное заболевание, рестеноз (например, рестеноз после ангиопластики), артериовенозную трансплантационную недостаточность, атеросклероз, гипертонию, гипертоническую болезнь сердца, гипертрофию сердца, гипертрофическую кардиомиопатию, сердечную недостаточность, заболевание аорты, прогрессирующий системный склероз, полимиозит, системную красную волчанку, дерматомиозит, фасцит, синдром Рейно, ревматоидный артрит, пролиферативную витреоретинопатию, витреоретинопатию любой этиологии или фиброз, связанный с глазной хирургией, такой как лечение глаукомы, реплантация сетчатки, удаление катаракты, или дренажными процедурами любого вида, рубцевание в роговице и конъюнктиве, фиброз в эндотелии роговицы, щелочной ожог (например, щелочной ожог в роговице), фиброз капсулы хрусталика после операции на катаракте, чрезмерное рубцевание в тканях вокруг расположенных вне глаз мышц при хирургическом лечении косоглазия, переднюю подкапсулярную катаракту и заднее подкапсулярное помутнение, переднесементарное фиброзное заболевание глаз, фиброз роговичной стромы (например, связанный с помутнением роговицы), фиброз трабекулярной сетки (например, связанный с глаукомой), заднесементарное фиброзное заболевание глаз, фиброваскулярное рубцевание (например, в сосудистой или хороидальной васкулатуре глаз), фиброз сетчатки, эпиретинальный фиброз, ретинальный глиоз, субретинальный фиброз (например, связанный с возрастной макулярной дегенерацией), фиброз, связанный с постретинальной хирургией и операцией на глаукоме, тракционное отслоение сетчатки в ассоциации с сужением ткани при диабетической ретинопатии, болезнь Пейрони, системный склероз, постспинальное кордовое повреждение, остеопороз, болезнь Камурати-Энгельманна, болезнь Крона, рубцевание, синдром Марфана, синдром истощения яичников, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, фиброз вследствие хирургических иссечений механической травмы, фиброз, связанный с глазной хирургией, и чрезмерное или гипертрофическое образование рубцов и келоидов на коже вследствие заживления ран, возникших в результате травм и хирургических повреждений, но не ограничиваются ими.

Примеры глазных заболеваний (например, окулярные, оптические, офтальмические или офтальмологические заболевания), состояний или нарушений включают фибропролиферативные нарушения, фиброз глаз, офтальмический фиброз, дисфункцию сетчатки, фиброз, связанный с дисфункцией сетчатки, влажную или сухую макулярную дегенерацию, пролиферативную витреоретинопатию, витреоретинопатию любой этиологии, фиброз, связанный с глазной хирургией, такой как лечение глаукомы, реплантация сетчатки, удаление катаракты, или дренажными процедурами любого вида, рубцевание в роговице и конъюнктиве, фиброз в эндотелии роговицы, щелочной ожог (например, щелочной ожог в роговице), фиброз капсулы хрусталика после операции на катаракте, чрезмерное рубцевание в тканях вокруг расположенных вне глаз мышц при хирургическом лечении косоглазия, переднюю подкапсулярную катаракту и заднее подкапсулярное помутнение, переднесементарное фиброзное заболевание глаз, фиброз роговичной стромы (например, связанный с помутнением роговицы), фиброз трабекулярной сетки (например, связанный с глаукомой), заднесементарное фиброзное заболевание глаз, фиброваскулярное рубцевание (например, в сосудистой или хороидальной васкулатуре глаз), фиброз сетчатки, эпиретинальный фиброз, ретинальный глиоз, субретинальный фиброз (например, связанный с возрастной макулярной дегенерацией), фиброз, связанный с постретинальной хирургией и операцией на глаукоме, тракционное отслоение сетчатки в ассоциации с сужением ткани при диабетической ретинопатии, но не ограничиваются ими.

Примеры фибропролиферативных заболеваний, состояний или нарушений глаз, глазного фиброза, окулярного фиброза или офтальмического фиброза включают пролиферативную витреоретинопатию, витреоретинопатию любой этиологии, фиброз, связанный с дисфункцией сетчатки, фиброз, связанный с влажной или сухой макулярной дегенерацией, фиброз, связанный с глазной хирургией, такой как лечение глаукомы, реплантация сетчатки, удаление катаракты, или дренажными процедурами любого вида, рубцевание в роговице и конъюнктиве, фиброз в эндотелии роговицы, фиброз, связанный со щелочным ожогом, фиброз капсулы хрусталика после операции на катаракте, чрезмерное рубцевание в тканях вокруг расположенных вне глаз мышц при хирургическом лечении косоглазия, переднюю подкапсулярную катаракту и заднее подкапсулярное помутнение, переднесементарное фиброзное заболевание глаз, фиброз роговичной стромы (например, связанный с помутнением роговицы), фиброз трабекулярной сетки (например, связанный с глаукомой), заднесементарное фиброзное заболевание глаз, фиброваскулярное рубцевание (например, в сосудистой или хороидальной васкулатуре глаз), фиброз сетчатки, эпиретинальный фиброз, ретинальный глиоз, субретинальный фиброз (например, связанный с возрастной макулярной дегенерацией), фиброз, связанный с постретинальной хирургией и операцией на глаукоме, тракционное отслоение сетчатки в ассоциации с сужением ткани при диабетической ретинопатии.

В разных вариантах осуществления изобретения, фибропролиферативное глазное заболевание, состояние или нарушение выбирают из группы, состоящей из пролиферативной витреоретинопатии, фиб-

роза, связанного с глазной хирургией, фиброза капсулы хрусталика после операции на катаракте, фиброза роговичной стромы и щелочного ожога.

"Имуноглобулин" или "природное антитело" является тетрамерным гликопротеином. У иммуноглобулина природного происхождения каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельный участок из приблизительно 100-110 или более аминокислот, в первую очередь ответственный за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, в первую очередь ответственную за эффекторную функцию. Человеческие легкие цепи классифицируют как каппа (κ) и лямбда (λ) легкие цепи. Тяжелые цепи классифицируют как мю (μ), дельта (Δ), гамма (γ), альфа (α) и эpsilon (ϵ) и определяют изотипы антител как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. В пределах легкой и тяжелой цепей вариабельные участки и константные области соединены участком "J" из приблизительно 12 или более аминокислот, с тяжелой цепью также включая участок "D" из приблизительно 10 или более аминокислот. См. в основном, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (включенную во всей полноте путем ссылок для всех целей). Вариабельные участки каждой пары легкой/тяжелой цепей образуют сайт связывания антитела, так что интактный иммуноглобулин имеет два сайта связывания.

Каждая тяжелая цепь на одном конце имеет вариабельный домен (VH), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь имеет вариабельный домен на одном конце (VL) и константный домен на другом конце; константный домен легкой цепи находится на одной линии с первым константным доменом тяжелой цепи, а вариабельный домен легкой цепи находится на одной линии с вариабельным доменом тяжелой цепи. Как полагают, отдельные аминокислотные остатки образуют границу раздела между вариабельными доменами легкой и тяжелой цепей (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987).

Вариабельные домены иммуноглобулина экспонируют одинаковую структуру относительно консервативных каркасных участков (FR), соединенных тремя гипервариабельными участками или CDR. От N-конца и до C-конца как легкая, так и тяжелая цепь содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Распределение аминокислот в каждом домене осуществляется в соответствии с определениями Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), или Chothia & Lesk, (*J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987); Chothia et al., (*Nature* 342:878-883, 1989).

Гипервариабельный участок антитела относится к CDR-аминокислотным остаткам антитела, ответственным за связывание антигена. Гипервариабельный участок содержит аминокислотные остатки из CDR [например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи, как описано Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] и/или аминокислотным остаткам из гипервариабельной петли (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи, как описано Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). CDR также можно идентифицировать и нумеровать согласно с нумерацией ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003)), которая описывает местоположение CDR в вариабельных доменах легкой и тяжелой цепей следующим образом: CDR1, приблизительно от 27 до 38 остатка; CDR2, приблизительно от 56 до 65 остатка; и CDR3, приблизительно от 105 до 116 (зародышевая линия) остатка или от 105 до 117 остатка (перестроенная). В одном варианте осуществления изобретения предусматривается, что CDR расположены приблизительно у остатков 26-31 (L1), 49-51 (L2) и 88-98 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и приблизительно у остатков 26-33 (H1), 50-58 (H2) и 97-111 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи антитела, длина тяжелой или легкой цепи которого соответствует цепям, раскрытым в данном документе. Однако, для специалиста в данной области техники понятно, что фактическое местоположение CDR-остатков может изменяться относительно прогнозируемых остатков, описанных выше, при идентификации последовательности конкретного антитела.

Каркасные или FR-остатки являются остатками вариабельного домена, отличающимися от остатков гипервариабельного домена.

"Вариабельный участок тяжелой цепи", как использовано в данном документе, относится к участку молекулы антитела, содержащему по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) вариабельного домена тяжелой цепи указанного антитела. Вариабельный участок тяжелой цепи может содержать один, два или три CDR тяжелой цепи указанного антитела.

"Вариабельный участок легкой цепи", как использовано в данном документе, относится к участку молекулы антитела, содержащему по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) вариабельного домена легкой цепи указанного антитела. Вариабельный участок легкой цепи может содержать один, два или три CDR легкой цепи указанного антитела, которая может быть или каппа, или лямбда легкой цепью в зависимости от антитела.

Термин "антитело" используется в широком смысле и включает полностью собранные антитела, тетрамерные антитела, моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), фрагменты антител, которые могут связывать антиген (например, Fab', F(ab)2, Fv, одноцепочечные антитела, диатела), и рекомбинантные белки, содержащие указанное выше, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность. "Иммуноглобулин" или "тетрамерное антитело" является тетрамерным гликопротеином, который состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, каждая из которых содержит вариабельный участок и константную область. Антигенсвязывающие области можно получить с помощью технологий рекомбинантных ДНК или ферментативным, или химическим расщеплением интактных антител. Фрагменты антител или антигенсвязывающие области включают, в частности, Fab, Fab', F(ab')2, Fv, доменное антитело (dAb), фрагменты определяющего комплементарности участка (CDR), CDR-привитые антитела, одноцепочечные антитела (scFv), фрагменты одноцепочечных антител, химерные антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, линейные антитела; хелатообразующие рекомбинантные антитела, триантитело или биантитело, интраантитело, наноантитело, иммунофармацевтическое средство на основе модульного белка малого размера (SMIP), антигенсвязывающий доменный иммуноглобулиновый слитый белок, верблюжье антитело, VHH-содержащее антитело, или их варианты или производные, и полипептиды, которые содержат по меньшей мере часть иммуноглобулина, достаточную для придания специфического антигенсвязывания полипептиду, такую как одна, две, три, четыре, пять или шесть последовательностей CDR, при условии, что антитело сохраняет желательную биологическую активность.

"Моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по сути гомогенных антител, то есть, отдельные антитела, содержащие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных мутаций природного происхождения, которые могут присутствовать в минимальном количестве.

"Вариант антитела", как использовано в данном документе, относится к полипептидной последовательности антитела, которая содержит по меньшей мере одно аминокислотное замещение, делецию или вставку в вариабельном участке в доменах вариабельных участков референсного антитела. Варианты могут быть по сути гомологичными или по сути идентичными немодифицированному антителу.

"Химерное антитело", как использовано в данном документе, относится к антителу, содержащему последовательность, полученную из двух разных антител (смотри, например, патент США № 4816567), которые, как правило, происходят из разных видов. Более часто, химерные антитела содержат фрагменты антител человека и грызунов, обычно человеческую константную область и мышинный вариабельный участок.

"Нейтрализующее антитело" является молекулой антитела, которая способна устранить или значительно сократить биологическую функцию антигена-мишени, с которым оно связывается. Таким образом, "нейтрализующее" антитело против мишени способно устранить или значительно сократить биологическую функцию, такую как ферментативная активность, связывание лигандов или внутриклеточную передачу сигналов.

"Выделенное" антитело является антителом, которое идентифицировано и отделено или извлечено из компонента его окружающей среды. Загрязняющими компонентами его окружающей среды являются материалы, которые препятствуют диагностическому или терапевтическому использованию антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие небелковые растворы. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения антитела очищают (1) до не меньше чем 95% по весу антитела, как определено по методу Лоури, и более предпочтительно до больше чем 99% по весу, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом или (3) до гомогенности с помощью SDS-PAGE при восстанавливающих или невосстанавливающих условиях, используя Кумасси голубой или, предпочтительно, серебряный краситель. Выделенное антитело включает антитело *in situ* внутри рекомбинантных клеток с тех пор, как не будет присутствовать по меньшей мере один компонент природной среды антитела. Несмотря на это, обычно изолированное антитело получают с помощью по меньшей мере одного этапа очистки.

Как использовано в данном документе, антитело, которое "специфически связывает" или является "мишеньспецифическим", или "специфическим для" мишени, или "иммунореактивным" с антигеном-мишенью, относится к антителу или антительному веществу, которое связывает антиген-мишень с большей аффинностью чем сходные антигены. В одном аспекте описания изобретения, связывающие мишень полипептиды или их фрагменты, варианты или производные будут связываться с большей аффинностью с человеческой мишенью по сравнению со своей аффинностью связывания с другими видами мишеней, то есть, нечеловеческими, но связывающие полипептиды, которые распознают и связывают ортологи мишени, охвачены предусмотренным объемом.

Например, полипептид, являющийся антителом или его фрагментом, "специфический к" своему родственному антигену обозначает, что вариабельные участки антител распознают и связывают интересующий полипептид с детектируемым предпочтением (то есть, способны отличить интересующий полипептид от других известных полипептидов того же семейства в силу измеримых различий в аффинности

связывания, несмотря на возможное наличие локальной идентичности последовательностей, гомологии или схожести между членами семейства). Известно, что специфические антитела могут также взаимодействовать с другими белками (например, белок A. S. aureus или другие антитела в методах ELISA) по причине взаимодействий с последовательностями вне варибельного участка антитела и, в частности, в константной области молекулы. Скрининговые анализы для определения специфичности связывания антитела для использования в методах согласно настоящему описанию хорошо известны и регулярно практикуются в уровне техники. Для всестороннего обсуждения таких анализов смотри Harlow et al. (Eds), *Antibodies A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Chapter 6. Антитела для использования в способах можно получить с использованием любого известного из уровня техники метода.

Термин "эпитоп" относится к части любой молекулы, способной быть распознанной и связанной с помощью селективно связывающего агента в одном или более антигенсвязывающих участках. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислотные или карбогидратные боковые цепи, и обладают трехмерными структурными характеристиками, а также и специфическими зарядными характеристиками. Эпитопы, как использовано в данном документе, могут быть смежными или несмежными. Более того, эпитопы могут быть миметическими (мимитопами), в том смысле, что они содержат трехмерную структуру, которая является идентичной эпитопу, используемому для получения антитела, еще не содержат или содержат только некоторые аминокислотные остатки, найденные у мишени, которые используются для стимулирования иммунного ответа антитела. Как использовано в данном документе, мимитоп не считается другим антигеном из эпитопной связи по отношению к селективно-связывающему агенту; селективно-связывающий агент распознает одну и ту же трехмерную структуру эпитопа и мимитопа.

Термин "производное", когда используется в связи с веществами антител и полипептидами согласно настоящему описанию, обозначает полипептиды, химически модифицированные с помощью таких технологий как убиквитинизация, конъюгирование терапевтических или диагностических агентов, мечение (например, радионуклидами или различными ферментами), ковалентное присоединение полимеров, такое как пегилирование (дериватизация с полиэтиленгликолем), и вставка или замещение путем химического синтеза аминокислот, таких как орнитин, которые обычно не встречаются в человеческих белках. Производные сохраняют связывающие свойства недериватизированных молекул согласно данному описанию.

"Обнаруживаемый фрагмент" или "метка" относится к композиции, обнаруживаемой с помощью спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических или химических средств. Например, полезные метки включают ³²P, ³⁵S, флуоресцентные красители, электроноплотные реагенты, ферменты (например, как общеиспользуемые в ELISA), биотин-стрептавидин, диоксигенин, гаптены и белки, для которых доступны антисыворотка или моноклональные антитела, или молекулы нуклеиновых кислот с последовательностью, комплементарной к мишени. Обнаруживаемый фрагмент часто производит измеримый сигнал, такой как радиоактивный, пигментообразующий, или флуоресцентный сигнал, который может быть использован для количественного анализа связанного обнаруживаемого фрагмента в образце.

Термин "терапевтически эффективное количество" используется в данном документе для обозначения количества мишенеспецифической композиции согласно описанию изобретения, которое является эффективным для смягчения или уменьшения симптомов, или признаков заболевания, связанного с экспрессией белка-мишени.

Термин "лечение", как использовано в отношении способов согласно данному документу, обозначает устранение, снижение, угнетение или смягчение временно, или навсегда, частично или полностью клинических симптомов, проявлений или прогрессирования явления, заболевания или состояния, связанных с экспрессией TGFβ. Такое лечение не должно быть абсолютным, чтобы быть полезным.

Настоящее описание изобретения предусматривает мишенеспецифическое антитело, которое может содержать примеры последовательностей, указанных в табл. 1, их фрагменты, варианты и производные, фармацевтические составы, включая мишенеспецифические антитела, перечисленные выше, способы приготовления фармацевтических составов и способы лечения пациентов фармацевтическими составами и композициями.

В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей иммуноглобулины могут определяться в разные классы, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, которые могут дополнительно разделяться на подклассы или изоформы, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Субединичные структуры и трехмерные конфигурации разных классов иммуноглобулинов хорошо известны. Разные изоформы имеют разные эффекторные функции; например, изоформы IgG1 и IgG3 обладают ADCC-активностью. Антитело, раскрытое в данном документе, если содержит константную область, может быть любым из этих подклассов или изоформ.

Антитела согласно настоящему описанию демонстрируют связывающую аффинность к одному или более антигенам TGFβ с Kd меньше, чем или равно приблизительно 10^{-5} M, меньше, чем или равно при-

близительно 10^{-6} М, или меньше, чем или равно приблизительно 10^{-7} М, или меньше, чем или равно приблизительно 10^{-8} М, или меньше, чем или равно приблизительно 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или 10^{-12} М или меньше. Такие аффинности можно легко определить, используя обычные методы, такие как равновесный диализ, использующие технологию поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, измерительное устройство Viascore 2000, используя основные процедуры, очерченные производителем); радиоиммуноанализ, использующий ^{125}I -меченый антиген-мишень; или другой метод, указанный в примерах ниже или известный специалистам в данной области техники. Данные аффинности можно анализировать, например, с помощью метода Scatchard et al., (*Ann N.Y. Acad. Sci.*, 51:660, 1949).

KinExA - анализ кинетического исключения также полезен для измерения аффинности антитела к его антигену. Технология KinExA измеряет явления связывания в растворимой фазе, а не явления связывания между растворимой фазой и твердой фазой. Кроме того, несмотря на то, что многие методы для измерения явлений связывания нуждаются по меньшей мере в одном реагенте для модификации через иммобилизацию или мечение, метод KinExA не требует модификации исследуемых молекул. Полагают, что метод KinExA делает возможным измерение более широкого диапазона связывающих констант, чем другие доступные в настоящее время методы. Дополнительное описание устройств для KinExA и проведения экспериментов по характеристике антител доступно от производителей (Sapidyne Instruments, Inc., Boise, ID) и может быть найдено в опубликованной литературе, патенте США № 6,664,114 и Darling et al., "Kinetic Exclusion Assay Technology: Characterization of Molecular Interactions." *Assay and Drug Development Technologies*, 2004, 2:647-657.

Трансформирующий фактор роста β .

TGF β является дисульфидно связанным димером, который синтезируется как препротеин из приблизительно 400 аминокислот (aa), который расщепляется перед секрецией для продуцирования зрелого TGF β . N-концевой фрагмент расщепления, известный как "связанный с латентностью белок" (LAP), может оставаться нековалентно связанным с димером, тем самым инактивируя TGF β . Выделенный *in vivo* TGF β обнаруживают преимущественно в неактивной, "латентной" форме, то есть, связанным с LAP. Латентный комплекс TGF β можно активировать несколькими путями, например, связыванием с поверхностноклеточным рецептором, называемым рецептором катионезависимого манозо-6-фосфатного/инсулиноподобного фактора роста II. Связывание возникает благодаря остаткам манозо-6-фосфата, присоединенным к сайтам гликозилирования в LAP. После связывания с рецептором TGF β высвобождается в своей зрелой форме. Затем зрелый, активный TGF β свободен для связывания со своим рецептором и проявления своих биологических функций. Основной связывающий домен TGF β у рецептора TGF β II типа закартирован до 19-аминокислотной последовательности (Demetriou et al., *J. Biol. Chem.*, 271:12755, 1996). Смотри также патент США 7867496.

В настоящее время существует пять известных изоформ TGF β (TGF β 1-TGF β 5; TGF β 1-3 обнаружен у млекопитающих, TGF β 4 обнаружен у цыплят, а TGF β 5 обнаружен у лягушек), все они являются гомологичными между собой (60-80% идентичность), образуют гомодимеры приблизительно 25 кДа и действуют на общие рецепторы TGF β (TGF β -RI, TGF β -RII, TGF β -RIIB и TGF β -RIII). Структурные и функциональные аспекты TGF β , а также рецепторов TGF β , хорошо известны из уровня техники (смотри, например, *Cytokine Reference*, eds. Oppenheim et al., Academic Press, San Diego, Calif., 2001). Между видами TGF β является консервативным. Например, аминокислотные последовательности зрелых TGF β 1 у крыс и человека почти идентичны. Смотри также патент США 7867496.

TGF β 1 играет важную роль в процессе заживления ран в биологических тканях (*New Engl. J. Med.*, Vol. 331, p.1286, 1994 и *J. Cell. Biol.*, Vol. 119, p. 1017, 1992). В участке раненой ткани биологические реакции, такие как инфильтрация воспалительных клеток и фибробластных клеток, продуцирование внеклеточного (ECM) и васкуляризация, и рост клеток для последующей регенерации ткани возникают для заживления поврежденной ткани. Смотри также патент США 7579186.

Лишенные TGF β 2 мыши демонстрируют значительные развивающиеся дефекты, включая дефекты сердца, легких, черепно-лицевые, конечностей, позвоночника, глаз, ушей и урогенитальные (Dunker et al., *Eur J Biol* 267:6982-8, 2001). Лишенные TGF β 3 мыши демонстрируют почти 100% летальность к 24 часам после рождения. Эти мыши демонстрируют значительное небное повреждение и задержанное легочное развитие (Dunker et al., *supra*). Также TGF β 2 вовлечен в развитие глаукомы (Luthen-Driscoll, *Experimental Eye Res* 81:1-4, 2005), фиброза, ассоциированного с болезнью Крона (Van Assche et al., *Inflamm Bowel Dis*. 10:55-60, 2004), в заживление ран и диабетическую нефропатию (Pohlert et al., *Biochim Biophys Acta* 1792:746-56, 2009).

Замечено, что многие человеческие опухоли (deMartin et al., *EMBO J.*, 6: 3673 (1987), Kupfner et al., *Int. J. Cancer*, 42: 562 (1988)) и многие опухолевые клеточные линии (Derynck et al., *Cancer Res.*, 47: 707 (1987), Roberts et al., *Br. J. Cancer*, 57: 594 (1988)) продуцируют TGF β и предлагают возможный механизм таким опухолям избегать нормальный иммунологический контроль.

Экспрессия изоформ TGF β в раковой опухоли является комплексной и изменчивой с разными комбинациями изоформ TGF β , играющими разные роли в отдельных раковых опухолях. Смотри, например,

патент США 7 927 593. Например, TGFβ1 и TGFβ3 могут играть более значительную роль в овариальном раке и его развитии, чем TGFβ2; между тем как экспрессия TGFβ1 и TGFβ2 является более значительной в опухолях хондросаркомы высшей степени, чем TGFβ3. При раке молочной железы человека TGFβ1 и TGFβ3 сильно экспрессируются с появлением экспрессии TGFβ3, чтобы коррелировать с полным выживанием пациентов с узелковым метастазом, а положительная экспрессия TGFβ3 имеет слабые прогностические результаты. Однако, при раке ободочной кишки TGFβ1 и TGFβ2 менее сильно экспрессируются, чем TGFβ3 и присутствуют в более высоких циркуляционных уровнях, чем у безраковых индивидуумов. При глиомах TGFβ2 является важным для клеточной миграции.

Экспрессия TGFβ вовлечена в начало различных тканевых фиброзов, таких как нефросклероз, фиброз легких и цирроз; а также в начало разных болезненных состояний, таких как хронический гепатит, ревматоидный артрит, сосудистый рестеноз и келоид кожи. Предусмотренные фиброзы, включающие фиброзы, связанные с заболеваниями или нарушениями (например, фибропролиферативные заболевания или нарушения) или лечением заболеваний или нарушений, включают фиброз легких, идиопатический фиброз легких, перибронхиолярный фиброз, интерстициальный фиброз легких, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), заболевание малых дыхательных путей (например, обструктивный бронхолит), эмфизему, развитой или острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), острое повреждение легких (ALI); фиброз легких, обусловленный инфекционными или токсическими агентами, фиброз почек, гломерулонефрит (GN) всех этиологии, например, мезенгиальнопролиферативный GN, иммунный GN и суставной GN, гломерулосклероз, тубулоинтерстициальное повреждение, почечный интерстициальный фиброз, почечный фиброз и все причины почечного интерстициального фиброза, почечный фиброз, вызванный осложнениями вследствие приема лекарств, включая циклоспориновую терапию трансплантатных реципиентов, например лечение циклоспорином, ВИЧ-ассоциированную нефропатию; отмирание трансплантата, диабетическое заболевание почек (например, диабетическую нефропатию), нефрогенный системный фиброз, диабет, идиопатический ретроперитонеальный фиброз, склеродерму, фиброз печени, заболевания печени, связанные с избыточным рубцеванием и прогрессирующим склерозом, включая цирроз печени всех этиологий, нарушения билиарного древа, нарушение функции печени, приписываемое инфекциям, кистозно-фиброзные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, такие как застойная сердечная недостаточность; дилатационная кардиомиопатия, миокардит, васкулярный стеноз, кардиальный фиброз (например, послеинфарктный кардиальный фиброз), постмиокардиальный инфаркт, гипертрофия левого желудочка, веноокклюзионное заболевание, рестеноз (например, рестеноз после ангиопластики), артериовенозную трансплантационную недостаточность, атеросклероз, гипертонию, гипертоническую болезнь сердца, гипертрофию сердца, гипертрофическую кардиомиопатию, сердечную недостаточность, заболевание аорты, прогрессирующий системный склероз; полимиозит, системную красную волчанку, дерматомиозит, фасцит, Синдром Рейно, ревматоидный артрит, пролиферативную витреоретинопатию, витреоретинопатию любой этиологии, фиброз, связанный с глазной хирургией, такой как лечение глаукомы, фиброз, связанный с дисфункцией сетчатки, ретиальной реплантацией, удалением катаракты, или дренажными процедурами любого вида, рубцевание в роговице и конъюнктиве, фиброз в эндотелии роговицы, фиброз, связанный со щелочным ожогом, фиброз капсулы хрусталика после операции на катаракте, чрезмерное рубцевание в тканях вокруг расположенных вне глаз мышц при хирургическом лечении косоглазия, переднюю подкапсулярную катаракту и заднее подкапсулярное помутнение, переднесегментарное фиброзное заболевание глаз, фиброз роговичной стромы (например, связанный с помутнением роговицы), фиброз трабекулярной сетки (например, связанный с глаукомой), заднесегментарное фиброзное заболевание глаз, фиброваскулярное рубцевание (например, в сосудистой или хороидальной васкулатуре глаз), фиброз сетчатки, эпиретинальный фиброз, ретинальный глиоз, субретинальный фиброз (например, связанный с возрастной макулярной дегенерацией), постретинальную и глаукомную хирургию, тракционное отслоение сетчатки в связи со сморщиванием ткани при диабетической ретинопатии, болезнь Пейрони, системный склероз, постспинальное кордовое повреждение, остеопороз, болезнь Камурати-Энгельманна, болезнь Крона, рубцевание, синдром Марфана, синдром истощения яичников, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, фиброз вследствие хирургических иссечений механической травмы, фиброз, связанный с глазной хирургией, и чрезмерное или гипертрофическое образование рубцов и келоидов на коже вследствие заживления ран, возникших в результате травм и хирургических повреждений, но не ограничиваются перечисленными.

При фиброзе легких и нефросклерозе концентрация TGFβ высокая и приводит к развитию болезненных состояний, таких как фиброз (Yamamoto et al., *Kidney Int.* 45:916-27, 1994 и Westergren-Thorsson et al., *J. Clin. Invest.* 92:632-7, 1993). Предполагается, что устойчивое повреждение тканей постоянно преобразовывает сигналы, чтобы экспрессировать TGFβ, угнетать негативную регуляцию сигнала для экспрессии TGFβ с помощью ECM или вызывать оба события синергически при фиброзе легких и нефросклерозе. Подавление активности TGFβ и накопление внеклеточного матрикса при диагностировании и лечении фибротических заболеваний с использованием ингибитора TGFβ раскрыто в WO 1991/04748, WO 1993/10808 и WO 2000/40227. Нейтрализующие анти-TGF-бета антитела использовались при лечении экспериментального диабетического заболевания почек (Han and Ziyadeh, *Peritoneal dialysis interna-*

tional, 19 Suppl 2: S234-237 (1999)). Смотри также патент США 7527791, дополнительно описывающий использование ингибиторов TGF β при различных показаниях, настоящим включен путем ссылки.

Примеры глазных заболеваний (например, окулярных, оптических, офтальмических или офтальмологических заболеваний), состояний или нарушений, включают фибропролиферативные нарушения, фиброз глаз, офтальмический фиброз, дисфункцию сетчатки, фиброз, связанный с дисфункцией сетчатки, влажную или сухую макулярную дегенерацию, пролиферативную витреоретинопатию, витреоретинопатию любой этиологии, фиброз, связанный с глазной хирургией, такой как лечение глаукомы, реплантация сетчатки, удаление катаракты, или дренажными процедурами любого вида, рубцевание в роговице и конъюнктиве, фиброз в эндотелии роговицы, щелочной ожог (например, щелочной ожог до роговицы), фиброз капсулы хрусталика после операции на катаракте, чрезмерное рубцевание в тканях вокруг расположенных вне глаз мышц при хирургическом лечении косоглазия, переднюю подкапсулярную катаракту и заднее подкапсулярное помутнение, переднесеgmentарное фиброзное заболевание глаз, фиброз роговичной стромы (например, связанный с помутнением роговицы), фиброз трабекулярной сетки (например, связанный с глаукомой), заднесеgmentарное фиброзное заболевание глаз, фиброваскулярное рубцевание (например, в сосудистой или хороидальной васкулатуре глаз), фиброз сетчатки, эпиретинальный фиброз, ретинальный глиоз, субретинальный фиброз (например, связанный с возрастной макулярной дегенерацией), фиброз, связанный с постретинальной хирургией и операцией на глаукоме, тракционное отслоение сетчатки в связи с сужением ткани при диабетической ретинопатии, но не ограничиваются перечисленными.

Примеры фибропролиферативных заболеваний, состояний или нарушений глаз, фиброза глаз, окулярного фиброза или офтальмического фиброза включают пролиферативную витреоретинопатию, витреоретинопатию любой этиологии, фиброз, связанный с дисфункцией сетчатки, фиброз, связанный с влажной или сухой макулярной дегенерацией, фиброз, связанный с глазной хирургией, такой как лечение глаукомы, реплантация сетчатки, удаление катаракты, или дренажными процедурами любого вида, рубцевание в роговице и конъюнктиве, фиброз в эндотелии роговицы, фиброз, связанный со щелочным ожогом, фиброз капсулы хрусталика после операции на катаракте, чрезмерное рубцевание в тканях вокруг расположенных вне глаз мышц при хирургическом лечении косоглазия, переднюю подкапсулярную катаракту и заднее подкапсулярное помутнение, переднесеgmentарное фиброзное заболевание глаз, фиброз роговичной стромы (например, связанный с помутнением роговицы), фиброз трабекулярной сетки (например, связанный с глаукомой), заднесеgmentарное фиброзное заболевание глаз, фиброваскулярное рубцевание (например, в сосудистой или хороидальной васкулатуре глаз), фиброз сетчатки, эпиретинальный фиброз, ретинальный глиоз, субретинальный фиброз (например, связанный с возрастной макулярной дегенерацией), фиброз, связанный с постретинальной хирургией и операцией на глаукоме, тракционное отслоение сетчатки в связи с сужением ткани при диабетической ретинопатии, но не ограничиваются перечисленными.

В разных вариантах осуществления изобретения фибропролиферативное глазное заболевание, состояние или нарушение выбирают из группы, состоящей из пролиферативной витреоретинопатии, фиброза, связанного с окулярной хирургией, фиброза хрусталика после операции по поводу катаракты, фиброза роговичной стромы и щелочного ожога.

Полипептиды антител.

Настоящее описание охватывает аминокислотные молекулы, кодирующие мишенеспецифические антитела. В примерах осуществления изобретения мишенеспецифическое антитело согласно описанию может содержать человеческую каппа (κ) или человеческую лямбда (λ) легкую цепь или аминокислотную последовательность, полученную из них, или человеческую тяжелую цепь или последовательность, полученную из нее, или легкую и тяжелую цепи вместе в одноцепочечной, или димерной, тетрамерной или других формах. В некоторых вариантах осуществления изобретения, тяжелая цепь и легкая цепь мишенеспецифического иммуноглобулина представляют собой разные аминокислотные молекулы. В других вариантах осуществления изобретения, та же самая аминокислотная молекула содержит переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи мишенеспецифического антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотная последовательность человеческого антитела против мишени содержит один или более CDR аминокислотной последовательности зрелого (то есть, отсутствующая сигнальная последовательность) переменного участка легкой цепи (VL) антител XPA.42.0 68, XPA.42.08 9 и XPA.42.681, указанных в табл. 1, или SEQ ID NO:4, 8 и 12 или их варианты, включая CDR, привитые, модифицированные, гуманизированные, химерные или человеческие генно-инженерные антитела или любые другие варианты, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, VL содержит аминокислотную последовательность от начала CDR1 до конца CDR3 легкой цепи любого из вышеуказанных антител.

В одном варианте осуществления изобретения, мишенеспецифическое антитело содержит CDR1, CDR2 или CDR3 легких цепей ((LCDR1, LCDR2, LCDR3), каждый из которых независимо выбирают из участков CDR1, CDR2 и CDR3 антитела, обладающего переменным участком легкой цепи, содержащим аминокислотную последовательность VL-участка, указанного в SEQ ID NO:4, 8 и 12, нуклеиновую

кислоту, кодирующую VL-участок, указанный в SEQ ID NO:4, 8 и 12, или кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей VL-участок, указанный в SEQ ID NO:3, 7 и 11. В одном варианте осуществления изобретения, CDR1 легкой цепи размещается приблизительно у остатков 24-34, CDR2 размещается приблизительно у остатков 50-56 и CDR3 размещается приблизительно у остатков 89-97 согласно нумерации Chothia. В альтернативном варианте осуществления, предусматривается, что CDR легкой цепи размещаются приблизительно от 27 до 38 остатка (CDR1); приблизительно от 56 до 65 остатка (CDR2); и приблизительно от 105 до 116 остатка (зародышевая линия) или от 105 до 117 остатка (CDR3) согласно нумерации ImMunoGenTics (IMGT). В одном варианте осуществления изобретения предусматривается, что CDR легкой цепи размещаются приблизительно у остатков 26-31 (L1), 49-51 (L2) и 88-97 (L3) в варибельном домене легкой цепи антитела, легкая цепь которого по длине приблизительно аналогична легким цепям, раскрытым в данном документе. Полипептид мишенеспецифического антитела может содержать участки CDR1, CDR2 и CDR3 антитела, содержащего аминокислотную последовательность участка VL, выбранного из группы, состоящей из XPA.42.068, XPA.42.089 и XPA.42.681.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, человеческое мишенеспецифическое антитело содержит один или более CDR аминокислотной последовательности зрелого (то есть, отсутствующая сигнальная последовательность) варибельного участка тяжелой цепи (VH) антитела XPA.42.068, XPA.42.089 и XPA.42.681, указанной в табл. 1 или SEQ ID NO:2, 6 и 10, или их варианты. В некоторых вариантах осуществления изобретения, VH содержит аминокислотную последовательность от начала CDR1 до конца CDR3 любой одной тяжелой цепи вышеуказанных антител.

В одном варианте осуществления изобретения, мишенеспецифическое антитело содержит CDR1, CDR2 или CDR3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) тяжелой цепи, каждый из которых независимо выбирают из участков CDR1, CDR2 и CDR3 антитела, обладающего варибельным участком тяжелой цепи, содержащим аминокислотную последовательность VH-участка, указанного в SEQ ID NO:2, 6 и 10, нуклеиновую кислоту, кодирующую VH-участок, указанный в SEQ ID NO:2, 6 и 10, или кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей VH-участок, указанный в SEQ ID NO:1, 5 и 9. Дополнительно предусматривается, что мишенеспецифическое антитело содержит CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи, каждый из которых независимо выбирают из участков CDR1, CDR2 и CDR3 антитела, обладающего варибельным участком тяжелой цепи, содержащим аминокислотную последовательность VH-участка, указанного в SEQ ID NO:2, 6, и 10. В одном варианте осуществления изобретения, CDR тяжелой цепи согласно нумерации Chothia размещаются: CDR1 приблизительно у остатков 26-35, CDR2 приблизительно у остатков 50-58 и CDR3 приблизительно у 95-102 (или 95-111, или 95-118). В альтернативном варианте осуществления, предусматривается, что CDR тяжелой цепи размещаются у CDR1, приблизительно от 27 до 38 остатка (CDR1); приблизительно от 56 до 65 остатка (CDR2); и CDR3, приблизительно от 105 до 116 (зародышевая линия) или от 105 до 117 остатка (CDR3) согласно нумерации ImMunoGenTics (IMGT). В одном варианте осуществления изобретения, предусматривается, что CDR тяжелой цепи размещаются приблизительно у остатков 26-33 (H1), 50-58 (H2) и 97-111 (H3) в варибельном домене тяжелой цепи антитела, тяжелая цепь которого по длине приблизительно аналогична тяжелым цепям, раскрытым в данном документе. Полипептид мишенеспецифического антитела может содержать участки CDR1, CDR2 и CDR3 антитела, содержащего аминокислотную последовательность участка VH, выбранного из группы, состоящей из XPA.42.068, XPA.42.089 и XPA.42.681.

В другом варианте осуществления изобретения, антитело содержит зрелый варибельный участок легкой цепи, как описано выше, и зрелый варибельный участок тяжелой цепи, как описано выше, необязательно спаренные как указано в табл. 1.

В примерах осуществления описание изобретения предполагает:

моноклональное антитело, которое вмещает любой один, два, три, четыре, пять или шесть HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3 любой одной из SEQ ID NO:13, 19 и 25; 14, 20 и 26; 15, 21 и 27 и SEQ ID NO:16, 22 и 28; 17, 23 и 29; и 18, 24 и 30, соответственно, необязательно содержащее одну или две мутации в любом из таких CDR, например, консервативное или неконсервативное замещение, и необязательно спаренные как указано в табл. 1;

моноклональное антитело, которое вмещает все HCDR1, HCDR2, HCDR3, или варибельный участок тяжелой цепи любой одной SEQ ID NO:13, 19 и 25; 14, 20 и 26; и 15, 21 и 27, необязательно содержащее одну или две мутации в любом из таких CDR, необязательно дополнительно содержащее пригодную константную область тяжелой цепи, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2 или IgE, ее человеческую последовательность или ее гибрид;

моноклональное антитело, которое вмещает все LCDR1, LCDR2, LCDR3, или варибельный участок легкой цепи любой одной SEQ ID NO:16, 22 и 28; 17, 23 и 29; и 18, 24 и 30, необязательно содержащее одну или две мутации в любом из таких CDR, необязательно дополнительно содержащее пригодную константную область легкой цепи, например, константную область каппа и лямбда легкой цепи, ее человеческую последовательность или ее гибрид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело содержит все три CDR легкой цепи, все три CDR тяжелой цепи, или все шесть CDR легкой и тяжелой цепи, спаренные как указано в табл. 1. В некоторых примерах осуществления два CDR легкой цепи из антитела могут комбинироваться с тре-

тым CDR легкой цепи из другого антитела. Альтернативно, LCDR1 из одного антитела может комбинироваться с LCDR2 из другого антитела и LCDR3 из еще другого антитела, особенно когда CDR являются высокомологичными. Аналогично, два CDR тяжелой цепи из антитела могут комбинироваться с третьим CDR тяжелой цепи из другого антитела; или HCDR1 из одного антитела может комбинироваться с HCDR2 из другого антитела и HCDR3 из еще другого антитела, особенно когда CDR являются высокомологичными.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, предусмотрено антитело, которое содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную вариабельному участку тяжелой цепи, указанному в SEQ ID NO:2, 6 и 10, и/или аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичную вариабельному участку легкой цепи, указанной в SEQ ID NO:4,8 и 12, антитело, дополнительно содержащее по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или все HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотная последовательность с процентной идентичностью с вариабельным участком легкой цепи может содержать один, два или три CDR легкой цепи. В других вариантах осуществления изобретения, аминокислотная последовательность с процентной идентичностью с вариабельным участком тяжелой цепи может содержать один, два или три CDR тяжелой цепи.

В другом варианте осуществления изобретения, предусмотрено антитело, которое содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную всем трем HCDR в вариабельном участке тяжелой цепи последовательности антитела в табл. 1, CDR указанным в SEQ ID NO:13, 19 и 25; 14, 20 и 26; и 15, 21 и 27.

В родственном варианте осуществления изобретения, предусмотрено антитело, которое содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную всем трем LCDR в вариабельном участке легкой цепи последовательности антитела в табл. 1, CDR, указанным в SEQ ID NO:16, 22 и 28; 17, 23 и 29; и 18, 24 и 30.

В дополнительном варианте осуществления изобретения, предусмотрено антитело, которое содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно на 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную всем шести CDR в тяжелой цепи и вариабельном участке легкой цепи последовательности антитела в табл. 1, CDR, указанным в SEQ ID NO:13, 19 и 25; 14, 20 и 26; и 15, 21 27; 16, 22 и 28; 17, 23 и 29; и 18, 24 и 30.

Предусматривается, что антитела согласно описанию могут иметь одно или два, или более аминокислотных замещений в участках CDR антитела, например, неконсервативные или консервативные замещения.

В родственном варианте осуществления изобретения, остатки каркаса изменяются. Каркасные участки тяжелой цепи, которые можно изменить, лежат в пределах участков, обозначенных H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4, которые окружают остатки CDR тяжелой цепи, а остатки каркасных участков легкой цепи, которые можно изменить, лежат в пределах участков, обозначенных L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4, которые окружают остатки CDR легкой цепи. Аминокислоту в пределах каркасного участка можно заменить, например, любой пригодной аминокислотой, идентифицированной в человеческом каркасе или человеческом консенсусном каркасе.

В примерах осуществления изобретения, анти-TGF β антитело, описанное в данном документе, специфически связывает по меньшей мере одну изоформу TGF β , выбранную из группы, состоящей из TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3. В других вариантах осуществления изобретения, анти-TGF β антитело специфически связывает: (a) TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3 ("пан-реактивное антитело" или "пан-связывающее антитело"); (b) TGF β 1 и TGF β 2; (c) TGF β 1 и TGF β 3; и (d) TGF β 2 и TGF β 3. В примерах осуществления изобретения, анти-TGF β антитело, описанное в данном документе, связывает по меньшей мере одну изоформу TGF β с аффинностью 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или 10^{-12} М или меньше (нижнее значение повышенной аффинности связывания), или необязательно две изоформы TGF β , или все TGF β 1, 2 или 3 с аффинностью 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или 10^{-12} М или меньше для одной или более изоформ. В других вариантах осуществления изобретения, антитело, описанное в данном документе, связывает TGF β 1 и TGF β 2 с по меньшей мере 2-50 кратно, 10-100 кратно, 2-кратно, 5-кратно, 10-кратно, 25-кратно, 50-кратно или 100-кратно или 20-50%, 50-100%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% высшей аффинностью (например, предпочтительно связывает TGF β 1 и TGF β 2) по сравнению со связыванием TGF β 3. Альтернативно, антитело, описанное в данном документе, связывает каждую TGF β -изоформу TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3 с 3-кратной, 5-кратной или 10-кратной аффинностью друг друга.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нейтрализация антителом TGFβ1 и TGFβ2 является по меньшей мере в 2-50 раз, 10-100 раз, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 25 раз, 50 раз или 100 раз или на 20-50%, 50-100%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% более сильной, чем нейтрализация TGFβ3.

Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей ХРА.42.089 указаны в SEQ ID NO:6 и 8, соответственно. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей ХРА.42.068 указаны в SEQ ID NO:2 и 4, соответственно, а аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей ХРА.42.681 указаны в SEQ ID NO:10 и 12, соответственно.

Нуклеиновые кислоты антител.

Настоящее описание изобретения также охватывает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие мишенеспецифические антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения, разные молекулы нуклеиновых кислот кодируют переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи мишенеспецифического антитела. В других вариантах осуществления изобретения, вышеупомянутая молекула нуклеиновой кислоты кодирует переменный участок тяжелой и легкой цепей мишенеспецифического антитела. В одном варианте осуществления изобретения, нуклеиновая кислота кодирует мишенеспецифическое антитело согласно настоящему описанию, а также любой полипептид, кодируемый нуклеиновыми кислотами, описанными в данном документе.

В одном аспекте, молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему описанию содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность VL антител ХРА.42.068, ХРА.42.089 и ХРА.42.681, указанную в SEQ ID NO:4, 8 и 12 или ее часть. В родственном аспекте, аминокислотная последовательность VL является консенсусной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность CDR легкой цепи указанного антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанная часть является прилегающей частью, содержащей CDR1-CDR3. В одном варианте осуществления изобретения, указанная часть содержит по меньшей мере один, два или три участка CDR1, CDR2 или CDR3 легкой цепи, необязательно с другим человеческим или человеческим консенсусным каркасом и необязательно с 1, или до 2, или до 3 мутаций совокупно в трех CDR.

В одном варианте осуществления изобретения настоящее описание предусматривает антигенсвязывающие соединения, включая функциональные фрагменты, имеющие аминокислотную последовательность переменного участка, указанную в любой одной из SEQ ID NO:2, 6 и 10 и 4, 8 и 12. В родственном варианте осуществления изобретения, вышеуказанное антигенсвязывающее соединение выбирают из группы, состоящей из полностью собранного тетрамерного антитела, моноклонального антитела, гуманизированного антитела; человеческого антитела; химерного антитела; мультиспецифического антитела, фрагмента антитела, Fab, F(ab')₂; Fv; scFv или одноцепочечного фрагмента антитела; диаантитела; триантитела, тетраантитела, миниантитела, линейного антитела; хелатообразующего рекомбинантного антитела, триантитела или биантитела, интраантитела, наноантитела, иммунофармацевтического средства на основе модульного белка малого размера (SMIP), антигенсвязывающего доменного иммуноглобулинового слитого белка, верблюжьего антитела, VHH-содержащего антитела или варианта или производного любого одного из этих антител, которые содержат одну или более последовательностей CDR согласно описанию и демонстрируют желательную биологическую активность, или смесь двух или более антител.

Антигенсвязывающие соединения согласно настоящему описанию преимущественно сохраняют аффинность связывания, составляющую 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} М или меньше для одного или более из TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

В одном аспекте, антитела согласно настоящему описанию содержат переменный участок тяжелой цепи или переменный участок легкой цепи, как это указано в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO:2, 6 и 10 и SEQ ID NO:4, 8 и 12, соответственно, как спарено в табл. 1. Дополнительно предполагается, что антитела могут содержать все или часть антител, изложенных в указанных выше аминокислотных последовательностях. В одном варианте осуществления изобретения, антитела содержат по меньшей мере один CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:2, 6 и 10, или по меньшей мере один CDR1, CDR2 или CDR3 легкой цепи SEQ ID NO:4, 8 и 12, как спарено в табл. 1.

В одном варианте осуществления изобретения, тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, идентифицированную как последовательность CDR3 тяжелой цепи. Такая "последовательность CDR3 тяжелой цепи" (HCDR3) содержит аминокислотную последовательность, идентифицированную как последовательность CDR3 тяжелой цепи, указанная в табл. 1, и SEQ ID NO:15, 21 и 27. Альтернативно, последовательность HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, которая содержит одну или более аминокислотных замен (например, замещение, вставку или делецию) по сравнению с любой аминокислотной последовательностью HCDR3, идентифицированной в табл. 1. Предпочтительные замещения включают замещение аминокислоты у соответствующего положения в другом HCDR3 из табл. 1. Альтернативно, последовательность HCDR3 содержит консенсусную аминокислотную последовательность HCDR3, описанную в данном документе.

Тяжелая цепь, содержащая последовательность HCDR3, описанную выше, может дополнительно содержать "последовательность CDR1 тяжелой цепи" (HCDR1), которая включает аминокислотные последовательности, идентифицированные как HCDR1 в SEQ ID NO:13, 19 и 25 и табл. 1, аминокислотные последовательности, которые содержат одну или более замен по сравнению с любым HCDR1, идентифицированным в SEQ ID NO:13, 19 и 25 и табл. 1, предпочтительно замещение аминокислоты у соответствующего положения в другом HCDR1 из табл. 1, или консенсусную последовательность HCDR1, описанную в данном документе.

Альтернативно, тяжелая цепь, содержащая последовательность HCDR3, описанную выше, может дополнительно содержать "последовательность CDR2 тяжелой цепи" (HCDR2), которая включает аминокислотные последовательности, идентифицированные как HCDR2 в SEQ ID NO:14, 20 и 26 и табл. 1, аминокислотные последовательности, которые содержат одну или более замен по сравнению с любым HCDR2, идентифицированным в SEQ ID NO:14, 20 и 26 и табл. 1, предпочтительно замещение аминокислоты у соответствующего положения в другом HCDR2 табл. 1, или консенсусную последовательность HCDR2, описанную в данном документе.

Тяжелая цепь, содержащая последовательность CDR3, описанную выше, может также содержать (a) последовательность CDR1 тяжелой цепи, описанную выше, и (b) последовательность CDR2 тяжелой цепи согласно изобретению, описанную выше.

Один аспект настоящего описания изобретения предусматривает антитело, которое связывает мишень-антиген, содержащее тяжелую цепь, которая содержит любую одну, две и/или три последовательности CDR тяжелой цепи, описанные выше.

Любая из последовательностей CDR тяжелой цепи, описанных выше, может также включать аминокислоты, добавленные к любому концу CDR. Приготовление вариантов или производных антител и антигенсвязывающих соединений согласно настоящему изобретению, включая "созревание аффинности", или приготовление вариантов или производных, содержащих аминокислотные аналоги, в данном документе описаны более подробно. Примеры вариантов включают варианты, содержащие консервативное или неконсервативное замещение соответствующей аминокислоты в аминокислотной последовательности, или замену аминокислоты соответствующей аминокислотой другой последовательности человеческого антитела.

Антитела, содержащие любую одну из тяжелых цепей, описанных выше, могут дополнительно содержать легкую цепь, предпочтительно легкую цепь, которая связывает мишень-антиген, и более предпочтительно легкую цепь, содержащую последовательности CDR легкой цепи, описанные ниже.

Другой аспект настоящего описания изобретения предусматривает антитело, которое связывает мишень-антиген, содержащее легкую цепь, которая содержит любую одну, две и/или три последовательности CDR легкой цепи, описанные ниже.

Предпочтительно легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, идентифицированную как последовательность CDR3 легкой цепи. Такая "последовательность CDR3 легкой цепи" (LCDR3) содержит аминокислотную последовательность, идентифицированную как последовательность CDR3 легкой цепи в табл. 1 и в SEQ ID NO:18, 24 и 30. Альтернативно, последовательность CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая содержит одну или более аминокислотных замен (например, замещение, вставку или делецию) по сравнению с любой аминокислотной последовательностью CDR3 легкой цепи, идентифицированной в табл. 1. Предпочтительные замещения включают замещение аминокислоты у соответствующего положения в другом CDR3 легкой цепи из табл. 1.

Легкая цепь, содержащая последовательность CDR3 легкой цепи, описанную выше, может дополнительно содержать "последовательность CDR1 легкой цепи", которая включает любую из аминокислотных последовательностей, идентифицированных как CDR1 легкой цепи в SEQ ID NO:16, 22 и 28 или табл. 1, аминокислотные последовательности, которые содержат одну или более аминокислотных замен по сравнению с любой последовательностью CDR1 легкой цепи, идентифицированной в SEQ ID NO:16, 22 и 28 или табл. 1, предпочтительно замещение аминокислоты у соответствующего положения в другом CDR1 легкой цепи из табл. 1.

Альтернативно, легкая цепь, содержащая последовательность CDR3 легкой цепи, описанную выше, может дополнительно содержать "последовательность CDR2 легкой цепи", которая включает любую из аминокислотных последовательностей, идентифицированных как CDR2 легкой цепи в SEQ ID NO:17, 23 и 29 или табл. 1, аминокислотные последовательности, которые содержат одну или более аминокислотных замен по сравнению с любой последовательностью CDR2 легкой цепи, идентифицированной в in табл. 1, предпочтительно замещение аминокислоты у соответствующего положения в другом CDR2 легкой цепи из SEQ ID NO:17, 23 и 29 или табл. 1.

В родственном аспекте, настоящее описание предполагает очищенный полипептид, содержащий по меньшей мере один HCDR из SEQ ID NO:13-15, 19-21 и 25-27 или LCDR из SEQ ID NO:16-18, 22-24 и 28-30, где каркасные участки переменных участков тяжелой цепи и каркасные участки переменных участков легкой цепи содержат каркасные участки человеческого антитела. В другом варианте осуществления изобретения, каркасные участки переменных участков тяжелой цепи и каркасные участки переменных участков легкой цепи химически изменяются путем аминокислотного замещения для боль-

шей гомологии к другой последовательности человеческого антитела. Например, в каждом каркасном участке тяжелой цепи (H-FR1-4) предусматривается, что по меньшей мере один по меньшей мере два по меньшей мере три по меньшей мере четыре по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть остатков нативного каркасного участка варибельного участка тяжелой цепи изменяется путем аминокислотного замещения, и где в каждом каркасном участке легкой цепи (L-FR1-4) по меньшей мере один по меньшей мере два по меньшей мере три по меньшей мере четыре по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть остатков нативного каркасного участка варибельного участка легкой цепи изменяется путем аминокислотного замещения.

Легкая цепь, содержащая последовательность CDR3 легкой цепи, описанную выше, может также содержать (а) последовательность CDR1 легкой цепи, описанную выше, и (b) последовательность CDR2 легкой цепи, описанную выше.

Антитела, содержащие любой один из варибельных участков легких цепей, описанных выше, может дополнительно содержать варибельный участок тяжелой цепи, необязательно спаренный как описано в табл. 1, предпочтительно варибельный участок тяжелой цепи, который связывает мишень-антиген, и более предпочтительно варибельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR тяжелой цепи, описанные выше.

В еще другом варианте осуществления изобретения, антитело содержит а варибельный участок тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO:2, 6 и 10, и варибельный участок легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO:4, 8 и 12.

В родственном аспекте, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи одной из SEQ ID NO:4, 8 и 12 или ее часть. В одном варианте осуществления изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность легкой цепи любой одной из SEQ ID NO:3, 7 и 11 или ее часть. Молекулы нуклеиновых кислот согласно описанию изобретения дополнительно содержат все последовательности нуклеиновых кислот, включая последовательности SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9 и 11, и последовательности нуклеиновых кислот содержат вырожденные кодоны, если исходить из варибельности генетического кода, кодирующие аминокислотную последовательность варибельных участков тяжелой и легкой цепей антитела, описанного в данном документе, или любой HCDR или LCDR, описанный в данном документе, и как это указано в SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12 и 13-30, а также нуклеиновые кислоты, которые гибридизируют в очень жестких условиях, таких как описано в данном документе, с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность варибельных участков тяжелой и легкой цепей антитела, описанного в данном документе, или любой HCDR или LCDR, описанный в данном документе, и как это указано в SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12 и 13-30.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности VL, указанной в SEQ ID NO:4, 8 и 12. Молекулы нуклеиновых кислот согласно описанию изобретения включают нуклеиновые кислоты, которые гибридизируют в очень жестких условиях, таких как описано в данном документе, с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность варибельного участка легкой цепи из SEQ ID NO:4, 8 и 12, или которая имеет последовательность нуклеиновой кислоты варибельного участка легкой цепи из SEQ ID NO:3, 7 и 11.

Дополнительно предполагается, что молекула нуклеиновой кислоты согласно описанию изобретения содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность VH любого одного из антител XPA.42.068, XPA.42.089 и XPA.42.681 или ее часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота кодирует аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи указанного антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанная часть является смежной частью, содержащей CDR1-CDR3 тяжелой цепи. В одном варианте осуществления изобретения, указанная часть содержит по меньшей мере один, два или три участка CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи, необязательно с другим человеческим или консенсусным человеческим каркасом, и необязательно с 1, или до 2, или до 3 мутаций совокупно в трех CDR.

В родственном аспекте, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность тяжелой цепи одной из SEQ ID NO:2, 6 и 10 тяжелой цепи или ее часть. В одном варианте осуществления изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность тяжелой цепи из SEQ ID NO:1, 5 и 9 или ее часть.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность VH, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности VH, указанной в SEQ ID NO:2, 6 и 10. В родственном аспекте, аминокислотная последовательность VH является консенсусной последовательностью. Молекулы нуклеиновых кислот согласно описанию изобретения дополнительно включают нуклеиновые кислоты, которые гибридизируют в очень жестких условиях, таких как описано в данном документе, с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность варибельного участка тяжелой цепи из SEQ ID NO:2, 6 и 10, или которая имеет последователь-

ность варибельного участка тяжелой цепи любой одной из SEQ ID NO:1, 5 и 9.

Дополнительно предполагается, что нуклеиновые кислоты согласно описанию изобретения могут кодировать непроцессированную легкую цепь или тяжелую цепь антитела, выбранного из ХРА.42.068, ХРА.42.089 и ХРА.42.681, где непроцессированная легкая цепь или тяжелая цепь содержит константную область легкой цепи или константную область тяжелой цепи, соответственно, константные области легкой цепи необязательно содержат немодифицированные или модифицированные каппа или лямбда участки, а константные области тяжелой цепи содержат немодифицированные или модифицированные константные области любого одного класса, такого как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD или IgE.

В одном аспекте, непроцессированная легкая цепь антитела содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:4, 8 и 12. Дополнительно предполагается, что нуклеотид, кодирующий непроцессированную легкую цепь, кодирует последовательности SEQ ID NO:4, 8 и 12 и содержит нуклеотидные последовательности, указанные в SEQ ID NO:3, 7 и 11.

В одном аспекте, непроцессированная тяжелая цепь антитела содержит любую одну из последовательностей SEQ ID NO:2, 6 и 10. Дополнительно предполагается, что нуклеотид, кодирующий непроцессированную тяжелую цепь, кодирует последовательности SEQ ID NO:2, 6 и 10 и содержит любую одну из последовательностей, указанных в SEQ ID NO:1, 5 и 9.

В дополнительных вариантах осуществления описание изобретения предусматривает антитело, которое связывает трансформирующий фактор роста бета (TGFB)1, TGFB2 и TGFB3, содержащее варибельный участок легкой цепи и/или варибельный участок тяжелой цепи, где (а) варибельный участок легкой цепи содержит по меньшей мере CDR1, выбранный из SEQ ID NO:16, 22 и 28 или последовательностей по меньшей мере на 80% идентичных им, CDR2, выбранный из SEQ ID NO:17, 23 и 29 или последовательностей по меньшей мере на 80% идентичных им, и/или CDR3, выбранный из SEQ ID NO:18, 24 и 30 или последовательностей по меньшей мере на 80% идентичных им; и/или где (b) варибельный участок тяжелой цепи содержит CDR1, выбранный из SEQ ID NO:13, 19 и 25 или последовательностей по меньшей мере на 80% идентичных им, CDR2, выбранный из SEQ ID NO:14, 20 и 26 или последовательностей по меньшей мере на 80% идентичных им, и/или CDR3, выбранный из SEQ ID NO:15, 21 и 27 или последовательностей по меньшей мере на 80% идентичных им.

В родственном варианте осуществления изобретения, варибельный участок легкой цепи содержит по меньшей мере CDR1, выбранный из SEQ ID NO:16 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранный из SEQ ID NO:17 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранный из SEQ ID NO:18 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей; и/или варибельный участок тяжелой цепи содержит CDR1, выбранный из SEQ ID NO:13 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранный из SEQ ID NO:14 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранный из SEQ ID NO:15 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей.

В другом варианте осуществления изобретения, варибельный участок легкой цепи содержит по меньшей мере CDR1, выбранный из SEQ ID NO:22 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранный из SEQ ID NO:23 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранный из SEQ ID NO:24 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей; и/или варибельный участок тяжелой цепи содержит CDR1, выбранный из SEQ ID NO:19 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранный из SEQ ID NO:20 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранный из SEQ ID NO:21 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей.

В еще другом варианте осуществления изобретения, варибельный участок легкой цепи содержит по меньшей мере CDR1, выбранный из SEQ ID NO:28 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранный из SEQ ID NO:29 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранный из SEQ ID NO:30 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей; и/или варибельный участок тяжелой цепи содержит CDR1, выбранный из SEQ ID NO:25 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, CDR2, выбранный из SEQ ID NO:26 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей, и CDR3, выбранный из SEQ ID NO:27 или последовательностей по меньшей мере на 90% идентичных ей.

В примерах осуществления изобретения, антитело согласно описанию содержит человеческую каппа (κ) или человеческую лямбда (λ) легкую цепь или аминокислотную последовательность, полученную из них, или человеческую тяжелую цепь или последовательность, полученную из нее, или тяжелую и легкую цепи вместе в одноцепочечной, димерной, тетрамерной или другой форме.

Моноклональные антитела.

Моноклональное антитело относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител. Моноклональные антитела, как правило, являются высокоспецифическими и могут быть направленными на один антигенный сайт, в отличие от препаратов обычных (поликлональных) антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против одной и той же или различных детерминант (эпитопов). В дополнение к их специфичности моноклональные антитела являются выигрышными

ми в том, что они синтезируются с помощью гомогенной культуры, незагрязненной другими иммуноглобулинами с разными специфичностями и характеристиками.

Моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридного метода, впервые описанного Kohler et al. (Nature, 256:495-7, 1975) (Harlow & Lane; *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1988); Goding, *Monoclonal antibody: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986), или могут быть получены с помощью методов рекомбинантных ДНК (смотри, например, патент США № 4816567). Моноклональные антитела могут быть выделены из библиотеки фагов антител с использованием методов, описанных, например, Clackson et al., (Nature 352:624-628, 1991) и Marks et al., (J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991). Дополнительные методы получения моноклональных антител хорошо известны специалисту в данной области техники.

Моноклональные антитела, такие как полученные с помощью указанных выше методов, соответствующим образом выделяют из культуральной среды, свободной жидкости брюшной полости или сывотки с помощью обычных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, белковая А-сефароза, хроматография с гидрофобным взаимодействием (HIC), ионообменная хроматография, хроматография на колонке с гидроксипатитом, гель-электрофорез, диализ и/или аффинная хроматография.

Дополнительно предполагается, что антитела согласно настоящему описанию могут использоваться в качестве меньших антигенсвязывающих фрагментов антител, которые хорошо известны из уровня техники и описаны в данном документе.

Фрагменты антител.

Фрагменты антител содержат часть интактного непроцессированного антитела, предпочтительно антигенсвязывающий или вариабельный участок интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диаантитела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv); фрагменты мультиспецифических антител, таких как биспецифические, триспецифические и тому подобных антител (например, диаантител, триантител, тетраантител); миниантител; хелатообразующее рекомбинантное антитело; триантитела или биантитела; интраантитела; наноантитела; иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP), антигенсвязывающий доменный иммуноглобулиновый слитый белок, верблюжье антитело, V_{HH}-содержащее антитело; и другие полипептиды, образованные из фрагментов антител. Смотри, например Holliger & Hudson (Nat. Biotech. 23:1126-36 (2005)).

Папаиновый гидролиз антител продуцирует два антигенсвязывающих фрагмента, названных фрагментом "Fab", моновалентные фрагменты, состоящие из доменов VL, VH, CL и CH, каждый с одним антигенсвязывающим сайтом, и остаточный фрагмент "Fc", название которого отображает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином дает фрагмент F(ab')₂, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, соединенных дисульфидным мостиком с шарнирной областью, которая имеет два "одноцепочечных Fv" или "scFv", фрагменты антител содержат домены VH и VL антитела, где эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Предпочтительно, полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который дает возможность Fv образовывать желательную структуру для антигенного связывания, что приводит к одноцепочечному антителу (scFv), в котором участки VL и VH спариваются с образованием моновалентной молекулы через синтетический линкер, который позволяет им быть в виде моновалентной цепи (Bird et al., Science 242:423-426, 1988, and Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). Для обзора scFv смотри Pluckthun, in *The Pharmacology of Monoclonal antibody*, vol. 1 13, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Фрагмент Fd состоит из доменов the VH и CH1.

Дополнительные фрагменты антител включают фрагмент доменного антитела (dAb) (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), который состоит из домена VH. Диаантитела являются бивалентными антителами, у которых домены VH и VL экспрессируются на монопептидной цепи, но с использованием линкера, который настолько короткий, что не позволяет образовывать пару между двумя доменами на одной и той же цепи, тем самым принуждая домены образовывать пары с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта (смотри, например, EP 404,097; WO 93/11161; Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993 и Poljak et al., Structure 2:1121-1123, 1994). Diabodies can be bispecific or monospecific.

Функциональные тяжелоцепочечные антитела, лишённые легких цепей, встречаются в природе у акул-нянек (Greenberg et al., Nature 374:168-73, 1995), ковриковых акул (Nuttall et al., Mol Immunol. 38:313-26, 2001) и у верблюжьих (Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-8, 1993; Nguyen et al., J. Mol. Biol. 275: 413, 1998), таких как верблюды, дромадеры, альпак и лам. У этих животных антигенсвязывающий сайт сводится к одному домену, V_{HH}-домену. Эти антитела образуют антигенсвязывающие участки, используя только вариабельный участок тяжелой цепи, то есть, эти функциональные антитела являются гомодимерами только тяжелых цепей, имеющими структуру H2L2 (под названием "тяжелоцепочечные антитела" или "HCAb"). По имеющимся данным верблюжьих V_{HH} рекомбинирует с константными областями IgG2 и IgG3, которые содержат шарнирную область, домены CH2 и CH3 и отсутствует домен CH1 (Hamers-Casterman et al., supra). Например, IgG1 ламы является обычным изотипом антитела (H2L2), в котором VH рекомбинирует с константной областью, которая содержит шарнирную область, домены CH1,

CH2 и CH3, между тем как IgG2 и IgG3 ламы являются только изотипами тяжелой цепи, у которых отсутствуют домены CH1 и которые не содержат легких цепей. Обнаружено, что верблужьи домены VHH связывают антиген с высокой аффинностью (Desmyter et al., *J. Biol. Chem.* 276:26285-90, 2001) и обладают высокой стабильностью в растворе (Ewert et al., *Biochemistry* 41:3628-36, 2002). Классические фрагменты только с VH тяжело получить в растворимой форме, но улучшения в растворимости и специфическом связывании могут быть получены, когда остатки каркаса заменить для большего подобия с VHH (смотри, например, Reichman, et al., *J Immunol Methods* 1999, 231:25-38). Способы получения антител, имеющих верблужьи тяжелые цепи описаны, например, в патентной публикации США № 20050136049 и 20050037421.

Вариабельный домен тяжелопептичного антитела является наименьшим полнофункциональным антигенсвязывающим фрагментом с молекулярной массой, составляющей только 15 кДа, этот объект назван нанотелом (Cortez-Retamozo et al., *Cancer Research* 64:2853-57, 2004). Библиотеку нанотел можно получить из иммунизированного дромадера, как описано в Congath et al., (*Antimicrob Agents Chemother* 45: 2807-12, 2001) или используя рекомбинантные методы, как описано в Revets et al., *Expert Opin. Biol. Ther.* 5(1):111-24 (2005).

Получение Fab-scFv ("биантитела") или триспецифического Fab-(scFv)(2) ("триантитела") описано в Schoonjans et al. (*J Immunol.* 165:7050-57, 2000) и Willems et al. (*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 786:161-76, 2003). Для биантител и триантител молекула scFv сливается с одной или обеими цепями VL-CL (L) и VH-CH1 (Fd), например, чтобы получить триантитело два scFvs сливаются с C-концом Fab, в то время как для получения биантитела один scFv сливается с C-концом Fab.

"Миниантитело", состоящее из scFv, слитого с CH3 через пептидный линкер (бесшарнирный) или через шарнир IgG, описано в Olafsen, et al., *Protein Eng Des Sel.* 17 (4):315-23, 2004.

Интраантитела являются одноцепочечными антителами, которые демонстрируют внутриклеточную экспрессию и могут манипулировать внутриклеточной белковой функцией (Biosca, et al., *EMBO J.* 9:101-108, 1990; Colby et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:17 616-21, 2004). Интраантитела, которые содержат клеточные сигнальные последовательности, которые сохраняют конструкцию антитела во внутриклеточных областях, можно получить, как описано в Mhashilkar et al (*EMBO J* 14:1542-51, 1995) и Wheeler et al. (*FASEB J.* 17:1733-5. 2003). Трансантитела являются проникающими в клетки антителами, у которых белковый трансдукционный домен (PTD) слит с вариабельным фрагментом одноцепочечных антител (scFv), Heng et al., (*Med Hypotheses.* 64:1105-8, 2005).

Дополнительно предусмотренными являются антитела, которые представляют собой SMIP или антигенсвязывающие доменные иммуноглобулиновые слитые белки, специфические к мишени-белку. Эти конструкции являются одноцепочечными полипептидами, содержащими антигенсвязывающие домены, слитые с иммуноглобулиновыми доменами, необходимыми для исполнения эффекторных функций антител. Смотри, например, WO 03/041600, патентную публикацию США 20030133939 и патентную публикацию США 20030118592.

Один или более CDR могут встраиваться в молекулу ковалентно или нековалентно, чтобы сделать ее иммуноадгезивом. Иммуноадгезин может включать CDR как часть более крупной полипептидной цепи, может ковалентно связывать CDR с другой полипептидной цепью или может включать CDR нековалентно. CDR позволяют иммуноадгезину специфически связываться с конкретным представляющим интерес антигеном.

Таким образом, с помощью известных из уровня техники методов могут быть получены различные композиции, содержащие один, два и/или три CDR (например, только один CDR или в тандеме, 2, 3 или другие множественные повторы CDR; или комбинации только 2 или 3 CDR или в тандемных повторах; необязательно, со спейсерной аминокислотной последовательностью между CDR или повторами) вариабельного участка тяжелой цепи или вариабельного участка легкой цепи антитела.

Мультиспецифические антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, желательно получить мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело против мишени, обладающее специфичностью связывания с по меньшей мере двумя разными эпитопами одной и той же молекулы или разных молекул. Примеры биспецифических антител могут связывать два разных эпитопа мишени-молекулы. Альтернативно, мишенеспецифическое плечо антитела может комбинироваться с плечом, которое связывает молекулы клеточной поверхности, такие как молекула рецептора Т-клеток (например, CD2 или CD3), или Fc-рецепторы для IgG (FcγR), такие как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), для того чтобы сфокусировать защитные клеточные механизмы на мишень. Биспецифические антитела могут также использоваться для того, чтобы локализовать цитотоксические агенты в клетках, которые экспрессируют или поглощают мишень. Эти тела обладают мишень-связывающим плечом и плечом, которое связывает цитотоксический агент (например, сапорин, антиинтерферон-60, алкалоид барвинка, рициновую А-цепь, метотрексат или радиоактивный изотоп гаптена). Биспецифические антитела можно получить как полноразмерные антитела или фрагменты антител (например, F(ab')₂ биспецифические антитела).

Согласно другому подходу получения биспецифических антител для того, чтобы максимизировать процентное содержание гетеродимеров, которые извлекаются из рекомбинантной клеточной культуры, с

помощью генно-инженерных методов можно получить интерфейс между парой молекул антител. Предпочтительный интерфейс содержит по меньшей мере часть домена СН3 константного домена антитела. В этом методе одну или более небольших аминокислотных боковых цепей из интерфейса молекулы первого антитела заменяют более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). Компенсирующие "пустоты" идентичного или сходного размера для больших боковых цепей создают на интерфейсе молекулы второго антитела путем замены больших аминокислотных боковых цепей менее крупными (например, аланином или треонином). Это дает механизм для увеличения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры. См. WO 96/27011.

Биспецифические антитела включают поперечно сшитые или "гетероконъюгатные" антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может соединяться с авидином, а другое с биотином. Гетероконъюгатные антитела можно получить с использованием любого пригодного метода для поперечного сшивания. Пригодные агенты для поперечного сшивания хорошо известны из уровня техники и раскрыты в патенте США № 4676980, наряду с методиками поперечного сшивания.

В литературе также описаны методы получения биспецифических антител из фрагментов антител. Например, биспецифические антитела можно получить с использованием химической связи. Brennan et al., (Science 229:81-83, 1985) описал процедуру, в которой интактные антитела протеолитически расщепляли для получения фрагментов F(ab')₂. Эти фрагменты восстанавливали в присутствии арсенита натрия, дитиольного комплексообразующего агента, чтобы стабилизировать вицинальные дитиолы и предотвратить образование внутримолекулярных дисульфидов. Полученные фрагменты Fab' затем превращали в тионитробензоатные производные (TNB). Один из производных Fab'-TNB затем реконвертировали в Fab'-тиол путем восстановления с меркаптоэтиламином и смешивали с эквимольным количеством другого производного Fab'-TNB для образования биспецифического антитела. Полученные биспецифические антитела можно использовать в качестве агентов для селективной иммобилизации ферментов. В еще дополнительном варианте осуществления изобретения фрагменты Fab'-SH, непосредственно извлеченные из *E. coli*, могут химически соединяться *in vitro* с образованием биспецифических антител (Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)).

Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) описали получение молекулы полностью гуманизованного биспецифического антитела F(ab')₂. Каждый фрагмент Fab' отдельно секретируют из *E. coli* и подвергают действию направленного химического связывания *in vitro* для образования биспецифического антитела. Полученное таким образом биспецифическое антитело способно связывать клетки, сверхэкспрессирующие рецептор HER2 и нормальные человеческие Т-клетки, а также вызывать литическую активность человеческих цитотоксических лимфоцитов против мишеней опухоли молочной железы человека.

Также описаны разные методики получения и выделения фрагментов биспецифических антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, биспецифические антитела получали с использованием лейциновых застежек (Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553, 1992). Пептиды с лейциновыми застежками из белков Fos и Jun присоединяли к Fab'-частям двух разных антител путем слияния генов. Гомодимерные антитела восстанавливали у шарнирной области для образования мономеров, а затем повторно окисляли для образования гетеродимерных антител. Этот метод можно также использовать для получения гомодимерных антител. Технология получения "диател", описанная Hollinger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 1993), обеспечивает альтернативный механизм получения фрагментов биспецифических антител.

Фрагменты содержат вариабельный участок тяжелой цепи (VH), присоединенный к вариабельному участку легкой цепи (VL) с помощью линкера, настолько короткого, что он не позволяет образовывать пару между двумя доменами на одной цепи. Таким образом, домены VH и VL одного фрагмента вынуждены образовывать пару с комплементарными доменами VL и VH другого фрагмента, тем самым образуя два антигенсвязывающих сайта. Сообщалось о другой стратегии получения фрагментов биспецифических антител с использованием одноцепочечных димеров Fv (scFv). См. Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994).

Альтернативно, биспецифическое антитело может быть "линейным антителом", полученным как описано в Zapata et al. Protein Eng. 8:1057-62 (1995). Линейные антитела содержат пару тандема сегментов Fd (VH -CH1-VH -CH1), которая образует пару антигенсвязывающих участков. Линейные антитела могут быть биспецифическими или моноспецифическими.

В дополнительном варианте осуществления изобретения, биспецифическое антитело может быть хелатообразующим рекомбинантным антителом (CRAb). Хелатообразующее рекомбинантное антитело распознает смежные и непересекающиеся эпитопы мишени-антигена и является достаточно гибким, чтобы связать оба эпитопа одновременно (Neri et al., J Mol Biol. 246:367-73, 1995).

Также предусмотрены антитела с более чем двумя валентностями. Например, можно получить триспецифические антитела (Tutt et al., J. Immunol. 147:60, 1991).

Химерные и гуманизированные антитела.

Поскольку химерные или гуманизированные антитела являются менее иммуногенными для людей

чем родительские нечеловеческие (например, мышинные) моноклональные антитела, то они могут использоваться для лечения людей с гораздо меньшим риском анафилактики.

Химерные моноклональные антитела, у которых варьируемые домены Ig нечеловеческого (например, мышинного) моноклонального антитела слиты с константными доменами человеческого Ig, можно получить с использованием стандартных процедур, известных из уровня техники (смотри Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855 (1984); и Boulianne et al, Nature 312, 643-646, (1984)).

Гуманизированные антитела можно получить с помощью различных методов, включая, например: (1) прививку нечеловеческих определяющих комплементарность участков (CDRs) на человеческий каркас и константную область (процесс, указанный в уровне техники как гуманизация посредством "прививка CDR"), (2) трансплантацию всех нечеловеческих варьируемых доменов, но "маскируя" их поверхностью, подобной к человеческой, путем замены поверхностных остатков (процесс, указанный в уровне техники как "винирование"), или, альтернативно, (3) замещение человеческих аминокислот в положениях, определенных как маловероятные для неблагоприятного действия на антигенсвязывание или укладку белка, но способных снижать иммуногенность в среде, окружающей человека (например, HUMAN ENGINEERING™). В настоящем описании гуманизированные антитела включают "гуманизированные," "винированные" и "HUMAN ENGINEERED™" антитела. Эти методы раскрыты, например, у Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyer et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31:169-217 (1994); Studnicka et al. Патент США № 5,766,886; Studnicka et al., (Protein Engineering 7: 805-814, 1994; Co et al., J. Immunol. 152, 2968-2976 (1994); Riechmann, et al., Nature 332:323-27 (1988); и Kettleborough et al., Protein Eng. 4:773-783 (1991), каждый из которых включен в данный документ путем ссылки.

Прививка CDR включает введение одного или более из шести CDR варьируемых доменов тяжелой и легкой цепи мышинного Ig в подходящие четыре каркасных участка варьируемых доменов человеческого Ig. Эта технология (Riechmann, et al., Nature 332:323-27 (1988)) использует консервативные каркасные участки (FR1-FR4) в качестве матрикса для поддержания CDR-петель, которые первыми контактируют с антигеном. Недостатком прививки CDR, однако, является то, что она может иметь результатом гуманизированное антитело, которое обладает значительно более низкой аффинностью связывания, чем оригинальное мышинное антитело, поскольку аминокислоты каркасных участков могут способствовать антигенсвязыванию и потому что аминокислоты CDR-петель могут влиять на ассоциацию двух варьируемых доменов Ig. Для поддержания аффинности гуманизированного моноклонального антитела технологию прививки CDR можно усовершенствовать путем выбора человеческих каркасных участков, которые наиболее напоминают каркасные участки оригинального мышинного антитела, и путем сайт-направленного мутагенеза отдельных аминокислот в каркасе или CDR с помощью компьютерного моделирования антигенсвязывающего сайта (например, Co et al., J. Immunol. 152, 2968-2976 (1994)).

Человеческие антитела из трансгенных животных.

Человеческие антитела к белкам-мишеням можно также получить, используя трансгенных животных, у которых нет эндогенно продуцированных иммуноглобулинов, а являются продуктом генной инженерии, чтобы содержать локусы иммуноглобулинов человека. Например, WO 98/24893 раскрывает трансгенных животных, имеющих локус человеческого Ig, причем животные не продуцируют функционально эндогенные иммуноглобулины в связи с инактивацией эндогенных локусов тяжелых и легких цепей. WO 91/00906 также раскрывает трансгенные млекопитающие хозяева не приматы, способные повысить иммунный ответ на иммуноген, где антитела имеют константный и/или варьируемые участки примата и где локусы, кодирующие эндогенные иммуноглобулины, замещены или инактивированы. WO 96/30498 и патент США № 6 091 001 раскрывают использование системы Cre/Lox для модификации иммуноглобулинового локуса у млекопитающих, такой как замена всех или части константных или варьируемых участков для образования молекулы модифицированного антитела. WO 94/02602 раскрывает млекопитающие хозяева не приматы, имеющие инактивированные локусы эндогенных Ig и локусы функциональных человеческих Ig. Патент США № 5 939 598 раскрывает методы получения трансгенных мышей, в которых мыши лишены эндогенных тяжелых цепей и экспрессируют локусы экзогенных иммуноглобулинов, содержащие одну или более ксеногенных константных областей. Смотрите также, патент США № 6114598, 6657103 и 6833268.

Используя трансгенное животное, описанное выше, можно получить иммунный ответ для отобранной антигенной молекулы, а клетки, продуцирующие антитела, можно выделить из животного и использовать для получения гибридом, которые секретируют человеческие моноклональные антитела. Протоколы иммунизации, адьюванты и тому подобное известны из уровня техники и используются для иммунизации, например, трансгенных мышей, как описано в WO 96/33735. Эта публикация раскрывает моноклональные антитела против ряда антигенных молекул, включая IL-6, IL-8, TNF α , CD4 человека, L селектин, gp39 и столбнячный токсин. Моноклональные антитела можно исследовать по поводу способности ингибировать или нейтрализовать биологическую активность или физиологический эффект соответственного белка. WO 96/33735 раскрывает, что моноклональные антитела против IL-8, полученные из

иммунных клеток трансгенных мышей, иммунизированных IL-8, блокировали индуцированные IL-8 функции нейтрофилов. Человеческие моноклональные антитела с специфичностью к антигену, использованные для иммунизации трансгенных животных, также раскрыты в WO 96/34096 и в патентной публикации США № 20030194404; и патентной заявке США № 20030031667.

Дополнительные трансгенные животные, полезные для получения моноклональных антител, включают Medarex HuMAb-MOUSE®, описанные в патенте США № 5770429 и Fishwild, et al. (Nat. Biotechnol. 14:845-851 (1996)), которые содержат генные последовательности из неперестроенных генов антител человека, которые кодируют тяжелые и легкие цепи антител человека. Иммунизация HuMAb-MOUSE® делает возможным получение полностью человеческих моноклональных антител к белку-мишени.

Также, Ishida et al. (Cloning Stem Cells. 4:91-102 (2002)) описывает мыши TransChromo (TCMOUSE™), которые содержат мегабазные сегменты человеческой ДНК и которые включают полный локус иммуноглобулина человека (hIg). TCMOUSE™ обладают полностью разнотипным репертуаром hIg, включая все подклассы IgG (IgG1-G4). Иммунизация TCMOUSE™ различными человеческими антигенами продуцирует гуморальный иммунный ответ, содержащий человеческие антитела.

Смотри также Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993); и патент США № 5591669, патент США № 5589369, патент США № 5 545 807; и патентную публикацию США № 20020199213. Патентная публикация США № 20030092125 описывает способы настройки иммунного ответа животного на желательный эпитоп. Человеческие антитела можно также получить с помощью *in vitro* активированных В-клеток (смотри патенты США № 5567610 и 5229275).

Человеческие антитела из технологии дисплея.

Развитие технологий для получения рекомбинантных генов антител человека и дисплея кодированных фрагментов антител на поверхности нитевидных бактериофагов обеспечило средства для получения непосредственно человеческих антител. Антитела, полученные с помощью фаговой технологии, продуцируются в качестве антигенсвязывающих фрагментов Fv в целом, или фрагментов Fab в бактерии и поэтому не обладают эффекторными функциями. Эффекторные функции можно ввести с помощью одной из двух стратегий: фрагменты можно получить с помощью генной инженерии, например, в полных антителах для экспрессии в клетках млекопитающих или в фрагментах биспецифических антител с вторым сайтом связывания, способным инициировать эффекторную функцию.

Настоящее описание предполагает способ получения мишенеспецифического антитела или его антигенсвязывающей части, включающий этапы синтеза библиотеки человеческих антител на фаге, скрининга библиотеки с белком-мишенью или его частью, выделение фага, который связывает мишень, и получение антитела из фага. Как пример, один способ получения библиотеки антител для использования в технологии фагового дисплея включает этапы иммунизации нечеловеческого животного, содержащего локусы иммуноглобулинов человека, антигеном-мишенью или его антигенной частью для создания иммунного ответа, извлечения клеток, продуцирующих антитела, из иммунизированных животных, выделения РНК из извлеченных клеток, обратного транскрибирования РНК для продуцирования кДНК, амплификации кДНК с использованием праймера и вставки кДНК в вектор фагового дисплея, вследствие чего антитела экспрессируются на фаге. Рекомбинантные мишенеспецифические антитела согласно описанию изобретения можно получить таким путем.

В другом примере, продуцирующие антитела клетки можно извлекать из неиммунизированных животных, выделенные из извлеченных клеток и реверсированные РНК транскрибировать для продуцирования кДНК, которую амплифицируют с использованием праймера и вставляют в вектор фагового дисплея, так что антитела экспрессируются на фаге. Процессы фагового дисплея осуществляют мимическое иммунное "просеивание" через дисплей спектров антител на поверхности нитевидных бактериофагов и последующее "просеивание" фага по его связыванию с предпочтительным антигеном. Одна такая технология описана в WO 99/10494, которая описывает выделение высокоаффинных и функциональных агонистических антител для рецепторов MPL и msk с использованием такого подхода. Антитела согласно описанию изобретения можно выделить с помощью скрининга комбинаторной библиотеки рекомбинантных антител, предпочтительно библиотеки scFv-фагового дисплея, полученной с использованием кДНК человеческих VL и VH, полученных из мРНК лимфоцитов человека. Методологии получения и скрининга таких библиотек известны из уровня техники. Смотри, например, патент США № 5969108. Существуют коммерчески доступные наборы для получения библиотек фагового дисплея (например, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, каталог № 27-9400-01; и Stratagene SurfZAP.TM. phage display kit, каталог № 240612). Существуют также другие методы и реагенты, которые можно использовать для получения и скрининга библиотек дисплея антител, (смотри, например, Ladner et al. Патент США № 5223409; Rang et al. публикация PCT WO 92/18619; Dower et al. публикация PCT WO 91/17271; Winter et al. публикация PCT WO 92/20791; Markland et al. публикация PCT WO 92/15679; Breitling et al. публикация PCT WO 93/01288; McCafferty et al. публикация PCT WO 92/01047; Garrard et al. публикация PCT WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybrids 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; Grif-

fiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; и Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982.

В одном варианте осуществления изобретения, для выделения человеческих антител, специфических к антигену-мишени, с желательными характеристиками библиотеку VH и VL человека "просеивают" по поводу отбора фрагментов антител, обладающих желательной специфичностью. Библиотеки антител, используемые в этом методе, предпочтительно являются scFv-библиотеками, полученными и "просеянными", как описано в данном документе и в уровне техники (McCafferty et al., публикация PCT WO 92/01047, McCafferty et al., (Nature 348:552-554 (1990)); и Griffiths et al., (EMBO J 12:725-734 (1993)). Библиотеки scFv преимущественно сортируют с использованием белка-мишени в качестве антигена.

Альтернативно, фрагмент Fd (VH-CH1) и легкую цепь (VL-CL) антител порознь клонируют с помощью ПЦР и рекомбинируют в произвольном порядке в комбинаторной библиотеке фагового дисплея, которую затем "просеивают" по поводу связывания с конкретным антигеном. Фрагменты Fab экспрессируют на поверхности фага, то есть, физически связываются с генами, которые их кодируют. Таким образом, отбор Fab путем антигенного связывания попутно отбирает кодирующие последовательности, которые могут амплифицироваться впоследствии. Из-за нескольких циклов антигенного связывания и реамплификации процедуры назвали пэннингом, специфический к антигену Fab обогащают и выделяют окончательно.

В 1994 был описан метод гуманизации антител, названный "направленной селекцией". Направленная селекция использует мощь технологии фагового дисплея для гуманизации мышиноного моноклонального антитела (смотри Jespers, L. S., et al., Bio/Technology 12, 899-903 (1994)). Для этого фрагмент Fd мышиноного моноклонального антитела воспроизводят в комбинации с библиотекой легких цепей человека, а полученную библиотеку гибридных Fab затем отбирают с помощью антигена. Таким образом, мышинный Fd-фрагмент обеспечивает шаблон для проведения селекции. Затем отобранные человеческие легкие цепи комбинируют с библиотекой человеческих Fd-фрагментов. Селекция полученной библиотеки дает полностью человеческий Fab.

Описано множество процедур получения человеческих антител из библиотек фагового дисплея (смотри, например, Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol, 222:581-597 (1991); патент США № 55653325573905; Clackson, T., and Wells, J. A., TIVTECH 12, 173-184 (1994)). В частности, *in vitro* селекция и выделение антител, полученных из библиотек фагового дисплея, становится мощным средством (смотри Burton, D. R., and Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994); Winter, G., et al., Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994); патентную публикацию США № 20020004215 и WO 92/01047; патентную публикацию США № 20030190317; и патент США № 6054287 и 5877 293).

Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift," Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178:187-193 (2002), и патентная публикация США №. 20030044772, опубликованная 6 марта 2003, описывают способы скрининга библиотек для фагового экспрессирования антител или других связывающих молекул с помощью подъема и захвата, способа, включающего иммобилизацию кандидатных связывающих молекул на твердой подложке.

Фрагменты Fv воспроизводят на поверхности фага путем связывания одной цепи, экспрессированной в виде фагово-белкового слияния (например, с M13 геном III), с комплементарной цепью, экспрессированной в виде растворимого фрагмента. Предусматривается, что фаг может быть нитеобразным фагом, таким как фаг из класса I фагов: fd, M13, f1, If1, lke, ZJ/Z, Ff и фагом из класса II фагов Xf, Pf1 и Pf3. Фаг может быть M13 или fd или их производным.

Сразу после скрининга исходных сегментов VL и VH человека для отбора предпочтительных комбинаций пар VL/VH проводят эксперименты "сочетания и комбинирования", в которых разные пары изначально отобранных сегментов VL и VH "просеивают" по поводу связывания мишени. Кроме того, с целью дополнительного усовершенствования качества антитела сегменты VL и VH предпочтительных пар VL/VH произвольным образом видоизменяют, преимущественно в пределах любого из участков CDR1, CDR2 или CDR3 VH и/или VL, в процессе, аналогичном *in vivo* процессу соматической мутации, ответственному за "созревание аффинности" антител во время природного иммунного ответа. Этого *in vitro* "созревания аффинности" можно добиться путем амплификации участков VL и VH с использованием ПЦР-праймеров, комплементарных VH CDR1, CDR2 и CDR3 или VL CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, эти праймеры "снабжены зубцами" случайной смешанной выборки четырех нуклеотидных оснований в определенных положениях, так что полученные ПЦР-продукты кодируют сегменты VL и VH, в которых случайные мутации введены в VH и/или VL CDR3-участки. Эти случайным образом мутированные сегменты VL и VH могут быть отобраны для связывания с антигеном-мишенью.

Вслед за скринингом и выделением мишенеспецифического антитела из библиотеки дисплея рекомбинантных иммуноглобулинов из дисплейного пакета (например, из фагового генома) можно выделить нуклеиновую кислоту, кодирующую отобранное антитело, и субклонировать в другие векторы экспрессии с помощью стандартных технологий рекомбинантных ДНК. Если желательно, то нуклеиновой кислотой можно дополнительно манипулировать для создания других форм антител согласно описанию

изобретения, как описано ниже. Чтобы экспрессировать человеческое антитело, выделенное с помощью скрининга комбинаторной библиотеки, ДНК, кодирующую антитело, клонируют в рекомбинантный вектор экспрессии и вводят в клетку-хозяин млекопитающего, как описано в данном документе.

Предусматривается, что метод фагового дисплея можно проводить в мутаторном штамме бактерии или в клетке-хозяине. Мутаторный штамм является клеткой-хозяином, имеющей генетический дефект, который вызывает в ней репликацию ДНК, мутированной по сравнению с ее родительской ДНК. Примером мутаторных штаммов являются NR9046mutD5 и NR9046 mut T1.

Также предусмотрено, что метод фагового дисплея можно проводить с использованием фага-помощника. Он является фагом, который используют для инфицирования клеток, содержащих дефектный фаговый геном, и который функционирует для укомплектования дефекта. Дефектный фаговый геном может быть фагемидой или фагом с такой же функцией, кодирующей удаленные генные последовательности. Примерами фагов-помощников являются M13K07, M13K07 ген III № 3; и фаг, отображающий или кодирующий связывающую молекулу, слитый с капсидным белком.

Антитела также получают с помощью скрининговых методов фагового дисплея с использованием иерархического двойного комбинаторного подхода, как описано в WO 92/01047, в котором отдельную колонию, содержащую клон цепи H или L, используют для инфицирования полной библиотеки клонов, кодирующих другую цепь (L или H), а получаемый двухцепочечный специфически связывающий элемент отбирают согласно методам фагового дисплея, таким как описанные в данном документе. Такой метод также описан у Marks et al, (Bio/Technology, 10:779-783 (1992)).

Методы для дисплея пептидов на поверхности дрожжевых, микробных клетках и клетках млекопитающих также могут использоваться для идентификации антигенспецифических антител. Смотри, например, патенты США № 5348867; 5723287; 6699 658; Wittrup, Curr Op. Biotech. 12:395-99 (2001); Lee et al, Trends in Biotech. 21(1) 45-52 (2003); Surgeeva et al, Adv. Drug Deliv. Rev. 58: 1622-54 (2006). Библиотеки антител можно присоединять к дрожжевым белкам, таким как агглютинин, эффективно имитируя дисплей для антител на клеточной поверхности с помощью В-клеток в иммунной системе.

Вдобавок к методам фагового дисплея антитела можно выделять с использованием *in vitro* методов дисплея и дисплея микробных клеток, включая рибосомный дисплей и дисплей мРНК (Amstutz et al, Curr. Op. Biotech. 12: 400-05 (2001)). Селекция полипептидов с использованием рибосомного дисплея описана у Hanes et al., (Proc. Natl Acad Sci USA, 94:4937-4942 (1997)) и патентах США № 5643768 и 5658754, выданных Кавасаки. Рибосомный дисплей также полезен для быстрого широкомасштабного мутационного анализа антител. Подход выборочного мутагенеза также обеспечивает метод получения антител с улучшенной активностью, которые можно отобрать с использованием технологий рибосомного дисплея.

Варианты аминокислотных последовательностей.

Предусматривается, что получают модифицированные полипептидные композиции, содержащие один, два, три, четыре, пять и/или шесть CDR антитела, где CDR изменяют для обеспечения повышенной специфичности или аффинности к молекуле-мишени. Сайты в пределах CDR антитела обычно модифицируют последовательно, например, путем замещения первого консервативными альтернативами (например, гидрофобную аминокислоту заменили неидентичной гидрофобной аминокислотой), и затем более непохожими альтернативами (например, гидрофобную аминокислоту заменили заряженной аминокислотой), а потом могут осуществляться делеции или вставки в целевой сайт. Например, используя консервативные каркасные последовательности, окружающие CDR, получают праймеры ПЦР, комплементарные этим консенсусным последовательностям, для амплификации антигенспецифичной последовательности CDR, находящейся между праймерными участками. Методы клонирования и экспрессирования нуклеотидных и полипептидных последовательностей хорошо обоснованы в уровне техники [смотри, например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York (1989)]. Амплифицированные последовательности CDR лигируют в подходящую плазмиду. Плазида, содержащая один, два, три, четыре, пять и/или шесть клонированных CDR, необязательно содержит дополнительные участки, кодирующие полипептиды, присоединенные к CDR.

Вещества антител, содержащие модифицированные CDR, отбирают на предмет аффинности связывания с оригинальным антигеном. Кроме того, антитело или полипептид дополнительно исследуют по поводу их способности нейтрализовать активность антигенов-мишеней. Например, антитела согласно описанию изобретения можно анализировать, как указано в Примерах, для определения их способности препятствовать биологической активности антигена-мишени.

Модификации можно осуществлять с помощью консервативных или неконсервативных замещений, описанных более детально ниже. "Вставки" или "делеции" составляют преимущественно от приблизительно 1 до 20 аминокислот, более предпочтительно от 1 до 10 аминокислот. Изменение можно вносить, систематически делая замещения аминокислот в полипептидной молекуле антитела, используя технологии рекомбинантных ДНК, и анализируя полученные рекомбинантные варианты по поводу активности. Изменения нуклеотидных кислот можно осуществлять у сайтов, которые отличаются по нуклеиновым кислотам из разных видов (вариабельные положения), или в высококонсервативных участках (константных участках). Методы изменения последовательностей антител и экспрессирования полипептидных

композиций антител, пригодные для изобретения, описаны более подробно ниже.

Вставки аминокислотных последовательностей включают N- и/или C-концевые слияния, достигающие в длину от одного остатка до полипептидов, содержащих тысячу или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или множества аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитела с N-концевым метионильным остатком или антитело (включая фрагмент антитела), слитое с эпитопной меткой или спасательным рецептор-связывающим эпитопом. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние с полипептидом, который повышает время полужизни антитела в сыворотке крови, например, у N-конца или C-конца.

Термин "эпитопно меченное" относится к антителу, слитому с эпитопной меткой. Полипептид эпитопной метки имеет достаточно остатков для обеспечения эпитопа, против которого может быть получено антитело, и при этом достаточно короткий, чтобы препятствовать активности антитела. Эпитопная метка предпочтительно является достаточно уникальной, чтобы агонистическое антитело по сути перекрестно не реагировало с другими эпитопами. Пригодные маркерные полипептиды, как правило, имеют по меньшей мере 6 аминокислотных остатков и обычно между приблизительно 8-50 аминокислотных остатков (предпочтительно между приблизительно 9-30 остатков). Примеры включают маркерный полипептид гриппозного гемагглютинина (HA) и его антитело 12CA5 (Field et al., *Mol. Cell. Biol.* 8: 2159-2165 (1988)); маркер на с-тус и антитела 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 и 9E10 вдобавок (Evan et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:3610-16 (1985)); и маркер на гликопротеине D (gD) симплексного вируса герпеса и его антитело (Pavovskiy et al., *Protein Engineering* 3:547-53 (1990)). Другим примером маркера является полигистидиновая последовательность, обычно около шести гистидиновых остатков, которая позволяет выделять соединение, меченное таким образом, используя никеливое хелирование. Другие метки и маркеры, такие как маркер FLAG® (Eastman Kodak, Rochester, NY), хорошо известные и обычно используемые в уровне техники, охвачены описанием изобретения.

Как использовано в данном документе, термин "спасательный рецепторсвязывающий эпитоп" относится к эпитопу участка Fc молекулы IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), котрый отвечает за *in vivo* увеличение времени полужизни молекулы IgG в сыворотке крови.

Другим типом варианта является аминокислотнозамещающий вариант. Эти варианты имеют по меньшей мере один удаленный аминокислотный остаток в молекуле антитела и вставленный на его место другой остаток. Предусматривается замещающий мутагенез в пределах любого из переменных или CDR участков или каркасных участков. Консервативные замещения включают замену аминокислоты другим представителем ее класса. Неконсервативные замещения включают замену представителя одного класса представителем другого класса.

Консервативные аминокислотные замещения осуществляют, исходя из сходства полярности, заряда, растворимости, гидрофобности и/или амфипатического характера включенных остатков. Например, неполярные (гидрофобные) аминокислоты включают аланин (Ala, A), лейцин (Leu, L), изолейцин (Ile, I), валин (Val, V), пролин (Pro, P), фенилаланин (Phe, F), триптофан (Trp, W) и метионин (Met, M); полярные нейтральные аминокислоты включают глицин (Gly, G), серин (Ser, S), треонин (Thr, T), цистеин (Cys, C), тирозин (Tyr, Y), аспарагин (Asn, N) и глутамин (Gln, Q); положительно заряженные (основные) аминокислоты включают аргинин (Arg, R), лизин (Lys, K) и гистидин (His, H); а отрицательно заряженные (кислотные) аминокислоты включают аспарагиновую кислоту (Asp, D) и глутаминовую кислоту (Glu, E).

Любой цистеиновый остаток, не включенный в поддержание надлежащей конформации антитела, также можно замещать, обычно серином, для улучшения устойчивости молекулы к окислению и для предотвращения aberrантного образования поперечных связей. Наоборот, цистеиновую связь(и) можно добавлять в антитело для улучшения его стабильности (особенно когда антитело является фрагментом антитела, таким как Fv-фрагмент).

"Созревание аффинности".

"Созревание аффинности", как правило, включает получение и селекцию вариантов антител, которые имеют замещения в CDR родительского антитела, и селекцию вариантов, которые имеют одно или более улучшенных биологических свойств, таких как, аффинность связывания, по сравнению с родительски антителом. Удобным способом получения таких замещающих вариантов является "созревание аффинности" с использованием фагового дисплея. Кратко, несколько сайтов гипервариабельных участков (например, 6-7 сайтов) можно изменить для получения всех возможных аминокислотных замещений в каждом сайте. Полученные таким образом варианты антител воспроизводятся моновалентным способом из частиц нитеобразного фага в виде слияний с продуктом гена III M13, упакованного в каждую частицу. Фагодисплейные варианты затем отбирают на предмет их биологической активности (например, аффинности связывания). Смотри, например, WO 92/01047, WO 93/112366, WO 95/15388 и WO 93/19172.

Обычные способы "созревания аффинности" антител относятся к двум категориям мутагенеза: случайному и неслучайному. Допускающая ошибки ПЦР, мутатор бактериальных штаммов (Low et al., *J. Mol. Biol.* 260, 359-68 (1996) Irving et al., *Immunotechnology* 2, 127-143 (1996)) и насыщающий мутагенез (Nishimiya et al., *J. Biol. Chem.* 275:12813-20 (2000); Chowdhury, P. S. *Methods Mol. Biol.* 178, 269-85 (2002)) являются обычными примерами методов случайного мутагенеза (Rajpal et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:8466-71 (2005)). Технологии неслучайного мутагенеза часто используют аланинсканирующий

или сайт-направленный мутагенез для получения ограниченных коллекций специфических вариантов. Некоторые методы описаны более подробно ниже.

"Созревание аффинности" методом пэннига - "созревание аффинности" рекомбинантных антител обычно проводят в течение несколько циклов "просеивания" кандидатных антител в присутствии уменьшающихся количеств антигена. Уменьшение количества антигена за цикл отбирает антитела с более высокой аффинностью к антигену, тем самым давая антитела высокой аффинности из большого пула стартового материала. "Созревание аффинности" через пэнниг является хорошо известным методом из уровня техники и описано, например, у Huls et al. (*Cancer Immunol Immunother.* 50:163-71 (2001)). Методы "созревания аффинности" с использованием технологий фагового дисплея описаны в других разделах этого документа и известны из уровня техники (смотри, например, Daugherty et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:2029-34 (2000)).

Просматривающий мутагенез - просматривающий мутагенез (LTM) (Rajpal et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:8466-71 (2005)) обеспечивает способ быстрого картирования сайта связывания антитела. Для LTM девять аминокислот, представляющих химические составы главной боковой цепи, предусмотренных 20 природными аминокислотами, отбирают для разделения функциональных вкладов боковой цепи в связывание в каждом положении во всех шести CDR антитела. LTM порождает позиционные серии единичных мутаций в пределах CDR, где каждый остаток "дикого типа" систематично замещается одной из девяти выбранных аминокислот. Видоизмененные CDR комбинируют для получения комбинаторных библиотек одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) увеличивающейся сложности и размера, которые не становятся препятствующими для количественного отображения всех вариантов. После положительной селекции клоны с улучшенным связыванием секвенируют и картируют полезные мутации.

Допускающая ошибки ПЦР - допускающая ошибки ПЦР включает рандомизацию нуклеиновых кислот между разными селекционными циклами. Рандомизация возникает медленно при предрасположенности к возникновению внутренних ошибок используемой полимеразы, но может повышаться с помощью допускающей ошибки ПЦР (Zaccolo et al., *J. Mol. Biol.* 285:775-783 (1999)) с использованием полимеразы, имеющей высокую предрасположенность к возникновению внутренней ошибки во время транскрипции (Hawkins et al., *J Mol Biol.* 226:889-96 (1992)). После мутационных циклов отбирают клоны с улучшенной аффинностью к антигену, используя стандартные методы уровня техники.

Перестановка в ДНК - перестановка нуклеиновых кислот является методом для *in vitro* или *in vivo* гомологической рекомбинации пулов коротких или маленьких полинуклеотидов для получения вариантных полинуклеотидов. Перестановка в ДНК описана в патенте США № 6605449, патенте США 6489145, WO 02/092780 и Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:10747-51 (1994). Как правило, перестановка в ДНК включает 3 этапа: фрагментирование генов, которые перетасовываются с дезоксирибонуклеазой I, случайную рандомизацию фрагментов и повторную сборку или заполнение фрагментированного гена с помощью ПЦР в присутствии ДНК-полимеразы (половая ПЦР), и амплификацию повторно собранного продукта стандартной ПЦР.

Перестановка в ДНК отличается от допускающей ошибки ПЦР тем, что является обратцепной реакцией. В допускающей ошибки ПЦР количество полимеразных стартовых сайтов и количество молекул растет экспоненциально. В отличие от этого, при повторной сборке нуклеиновых кислот или перестановке случайных полинуклеотидов количество стартовых сайтов и количество (но не размер) случайных полинуклеотидов уменьшается со временем.

В случае антитела перестановка в ДНК допускает свободное комбинаторное связывание всех CDR1 со всеми CDR2 и со всеми CDR3, например. Предусматривается, что многочисленные семейства последовательностей могут переставляться в одной и той же реакции. Кроме того, перестановка обычно сохраняет относительный порядок, благодаря чему, например, CDR1 не может быть обнаружен в положении CDR2. Немногочисленные перестановки могут содержать большое количество лучших (например, с высшей аффинностью) CDR и эти немногочисленные перестановки можно отобрать, исходя из их превосходящей аффинности.

Матричным полинуклеотидом, который можно использовать в перестановке в ДНК, может быть ДНК или РНК. Он может иметь различную длину в зависимости от размера или быть коротким или маленьким полинуклеотидом, чтобы рекомбинироваться или повторно собираться. Предпочтительно матричный полинуклеотид состоит из 50 п.о.- 50 т.н. Часто матричный полинуклеотид бывает двухцепочечным.

Предусматривается, что одноцепочечные или двухцепочечные полинуклеотиды, имеющие участки, идентичные матричному полинуклеотиду, и участки, гетерологичные матричному полинуклеотиду, могут добавляться к матричному полинуклеотиду в течение исходного этапа генной селекции. Также предусматривается, что на исходном этапе можно смешивать две разные, но родственные полинуклеотидные матрицы.

Аланиновое сканирование - сканирующий аланином мутагенез можно проводить для идентификации остатков гипервариабельных участков, которые делают значительный взнос в связывание антигена. Cunningham and Wells, (*Science* 244:1081-1085 (1989)). Остаток или группу целевых остатков идентифицируют (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и заменяют нейтральной или

отрицательно заряженной аминокислотой (более предпочтительно аланином или полиаланином), чтобы воздействовать на взаимодействие аминокислот с антигеном. Те аминокислотные локализации, которые демонстрируют функциональную чувствительность к замещениям, затем усовершенствуют путем введения дополнительных или других вариантов в сайты замещения.

Компьютерное конструирование - альтернативно или дополнительно может быть полезным при анализе кристаллической структуры комплекса антиген-антитело для идентификации контактных точек между антителом и антигеном или для использования компьютерного программного обеспечения для моделирования таких контактных точек. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами для замещения в соответствии с технологиями, разработанными в данном документе. Получив такие точки, панель вариантов подвергают скринингу, как описано в данном документе, а антитела с превосходящими свойствами в одном или более релевантных анализах отбирают для дальнейшего развития.

Альтернативно или дополнительно, можно использовать ряд других технологий "созревания аффинности", известных из уровня техники, включая, например, технологии, описанные в опубликованных патентных заявках WO2009/088933; WO2009/088928; WO2009/088924; а также Clackson et al., *Nature* 352:624-628, 1991; Marks et al., *Biotechnology* 10:779-783, 1992; Virnekas et al., *Nucleic Acids Res.* 22:5600-5607, 1994; Glaser et al., *J. Immunol.* 149:3903-3913, 1992; Jackson et al., *J. Immunol.* 154:3310-3319, 1995; Schier et al., *J. Mol. Biol.* 255:28-43, 1996; и Yang et al., *J. Mol. Biol.* 254:392-403, 1995, полностью включенные в данный документ посредством ссылок.

Измененное гликозилирование.

Можно также получить варианты антител, которые имеют модифицированный профиль гликозилирования по сравнению с родительским антителом, например, делецию одного или более углеводных фрагментов, обнаруженных у антитела, и/или добавление одного или более сайтов гликозилирования, которых не было у антитела.

Гликозилирование антител обычно является N-связанным или O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением пролина, являются опознавательными последовательностями для ферментативного присоединения углеводного фрагмента аспарагиновой боковой цепи. Присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. Таким образом, сайты N-связанного гликозилирования можно добавлять к антителу путем изменения аминокислотной последовательности так, чтобы она содержала одну или более этих трипептидных последовательностей. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из Сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, чаще всего к серину или треонину, хотя 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин также могут использоваться. Сайты O-связанного гликозилирования можно добавлять к антителу путем вставки или замещения одного или более сериновых или треониновых остатков в последовательности оригинального антитела.

Fc-гликаны влияют на связывание IgG с рецепторами Fc и C1q и поэтому являются важными для эффекторных функций IgG. Можно получить варианты антител с модифицированными Fc-гликанами и измененной эффекторной функцией. Например, антитела с измененными концевыми сахарами, такими как остатки сиаловых кислот, кора фукозы, бисекторного N-ацетилглюкозамина и манозы, могут обладать измененным связыванием с рецептором FcγRIIIa и измененной активностью ADCC. В дополнительном примере антитела с модифицированными концевыми остатками галактозы могут обладать измененным связыванием с C1q и измененной активностью CDC (Raju, *Curr. Opin. Immunol.* 20: 471-78 (2008)).

Также предусмотрены молекулы антител с отсутствующим или сниженным фукозилированием, которые демонстрируют улучшенную активность ADCC. Из уровня техники известно множество путей для достижения этого. Например, эффекторная активность ADCC медируется связыванием молекулы антитела с рецептором FcγRIII который, как показано, зависит от углеводной структуры N-связанного гликозилирования на Asn-297 домена CH2. Нефукозилированные антитела связывают этот рецептор с увеличенной аффинностью и триггерными FcγRIII-опосредованными эффекторными функциями более эффективно, чем природные фукозилированные антитела. Например, рекомбинантное продуцирование нефукозилированного антитела в клетках CHO, у которых фермент альфа-1,6-фукозилтрансферазы поврежден, дает антитело с 100-кратно увеличенной активностью ADCC (Yamane-Ohnuki et al., *Biotechnol Bioeng.* 87:614-22 (2004)). Подобных эффектов можно достичь путем снижения активности этого или других ферментов метаболического пути фукозилирования, например, через обработку мРНК или антисмысловых РНК, генное конструирование клеточных линий для выключения гена фермента(ов) или культивирование с селективными ингибиторами гликозилирования (Rothman et al., *Mol Immunol.* 26:1113-23 (1989)). Некоторые штаммы клеток-хозяев, например, Lec13 или клеточная линия YB2/0 гибридомы крыс, естественным образом продуцируют антитела с низкими уровнями фукозилирования. (Shields et al., *J Biol Chem.* 277:26733-40 (2002); Shinkawa et al., *J Biol Chem.* 278:3466-73 (2003)). Повышение уровня разделенного пополам углевода, например, путем рекомбинантного продуцирования антитела в клетках,

которые сверхэкспрессируют фермент GnTIII, также может определять увеличение активности ADCC (Umana et al., *Nat Biotechnol.* 17:176-80 (1999)). Было предсказано, что отсутствие только одного из двух остатков фукозы может значительно увеличить активность ADCC (Ferrara et al., *Biotechnol Bioeng.* 93:851-61 (2006)).

Варианты с измененной эффекторной функцией.

Предусмотрены и другие модификации антитела. В одном аспекте, может быть желательной модификация антитела согласно описанию в отношении эффекторной функции, например, для увеличения эффективности антитела при лечении рака. Один способ модификации эффекторной функции указывает, что остаток(и) цистеина можно вводить в участок Fc, тем самым делая возможным образование внутрицепочечных дисульфидных связей в этом участке. Полученное таким образом гомодимерное антитело может иметь улучшенную способность к интернализации и/или увеличенный клеточный килинг, опосредованный комплементом, и антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC). Смотри Caron et al., (*J. Exp Med.* 176: 1191-1195 (1992)) и Shopes, B. (*J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992)). Гомодимерные антитела с повышенной противоопухолевой активностью также можно получить с использованием гетеробифункциональных кросслинкеров, как описано у Wolff et al., (*Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993)). Альтернативно, антитело, которое имеет двойные участки Fc и поэтому может обладать увеличенными комплемент-лизисом и возможностями ADCC, можно получить генно-инженерным путем. Смотри Stevenson et al., (*Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989)). Кроме того, было показано, что последовательности в пределах CDR могут вызывать связывание антитела с классом II MHC и инициацию нежелательного ответа хелперных Т-клеток. Консервативное замещение может позволить антителу сохранить связывающую активность, при этом потеряв способность к иницированию нежелательного ответа Т-клеток. Также смотри Steplewski et al., (*Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:4852-56 (1998)), который описывает химерные антитела, у которых мышинный вариабельный участок присоединен к гамма 1, гамма 2, гамма 3 и гамма 4 константным областям человека.

В определенных вариантах осуществления изобретения согласно настоящему описанию желательным может быть использование фрагмента антитела, а не интактного антитела, для повышения опухолевой пенетрации, например. В этом случае желательной может быть модификация фрагмента антитела с целью повышения его времени полужизни в сыворотке крови, например, путем добавления молекул, таких как ПЭГ или других водорастворимых полимеров, включая полисахаридные полимеры, к фрагментам антител для повышения времени полужизни. Этого также можно достичь, например, внедрением эпитопа, связывающего спасательный рецептор, в фрагмент антитела (например, путем мутации подходящего участка в фрагменте антитела или путем внедрения эпитопа в маркерный пептид, который затем сливают с фрагментом антитела на любом конце или посередине, например, с помощью ДНК или пептидного синтеза) (смотри, например, WO 96/32478).

Эпитоп, связывающий спасательный рецептор, предпочтительно представляет собой участок, где любой один или более аминокислотных остатков из одной или двух петель Fc-домена переносят в аналогичное положение фрагмента антитела. Более предпочтительно, когда переносят три или более остатков из одной или двух петель. Еще более предпочтительно, когда эпитоп берут из домена CH2 участка Fc (например, IgG) и переносят в CH1, CH3 или участок VH, или в более чем один такой участок антитела. Альтернативно, эпитоп берут из домена CH2 участка Fc и переносят в участок CL или участок VL, или в оба эти участка фрагмента антитела. Смотри также международные публикации WO 97/34631 и WO 96/32478, которые описывают варианты Fc и их взаимодействие с спасательным рецептором.

Таким образом, антитела согласно настоящему описанию могут содержать часть человеческого Fc, часть человеческого консенсусного Fc или их варианты, которые сохраняют способность взаимодействовать с Fc спасательного рецептора, включая варианты, в которых цистеины, включенные в дисульфидное связывание, модифицированы или удалены, и/или в которых метионин добавляют к N-концу, и/или одна или более из 20 аминокислот на N-конце удалены, и/или участки, которые взаимодействуют с комплементом, таким как связывающий сайт C1q, удалены, и/или сайт ADCC удален [смотри, например, Sarmay et al., *Molec. Immunol.* 29:633-9 (1992)].

Ранее проведенные исследования картировали сайт связывания на человеческом и мышинном IgG для FcR главным образом до нижнего шарнирного участка, состоящий из остатков 233-239 IgG. Другие исследования предложили дополнительные широкие сегменты, например, Gly316-Lys338 для рецептора I человеческого Fc, Lys274-Arg301 и Tyr407-Arg416 для рецептора III человеческого Fc, или обнаружили несколько специфических остатков вне нижнего шарнира, например, Asn297 и Glu318 для мышинного IgG2b, взаимодействующих с рецептором II мышинного Fc. Сообщение о 3,2-Å кристаллической структуре фрагмента Fc человеческого IgG1 с рецептором IIIA человеческого Fc установило границы остатков IgG1 Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299 и Ala327-Ile332, как включенных в связывание с рецептором IIIA участка Fc. Исходя из кристаллической структуры, было предложено, что в дополнение к нижнему шарниру (Leu234-Gly237), остатки в IgG CH2 доменных петлях FG (остатки 326-330) и BC (остатки 265-271) могут играть роль в связывании с рецептором ПА участка Fc. Смотри Shields et al., (*J. Biol. Chem.*, 276:6591-604 (2001)), включенного во всей полноте в данный документ. Мутация участков в пределах сайтов связывания рецепторов Fc может привести к измененной эффекторной функции, такой

как измененная активность ADCC или активность CDC, или измененному времени полужизни. Как описано выше, потенциальные мутации включают вставку, делецию или замещение одного или более остатков, включая замещение аланином, консервативное замещение, неконсервативное замещение или замену соответствующим аминокислотным остатком у того же положения из другого подкласса IgG (например, замена остатка IgG1 соответствующим остатком IgG2 в том же положении).

Shields et al. сообщили, что остатки IgG1, включенные в связывание всех рецепторов человеческого Fc, находятся в домене CH2, проксимальном к шарнирному участку, и разделяются на две следующие категории: 1) положения, которые могут взаимодействовать непосредственно со всеми FcR, включают Leu234-Pro238, Ala327 и Pro329 (и, возможно, Asp265); 2) положения, которые влияют на углеводную природу или положение, включают Asp265 и Asn297. Дополнительные остатки IgG1, которые действуют на связывание с рецептором II участка Fc, являются следующими: (наибольший эффект) Arg255, Thr256, Glu258, Ser267, Asp270, Glu272, Asp280, Arg292, Ser298 и (меньший эффект) His268, Asn276, His285, Asn286, Lys290, Gln295, Arg301, Thr307, Leu309, Asn315, Lys322, Lys326, Pro331, Ser337, Ala339, Ala378 и Lys414. A327Q, A327S, P329A, D265A и D270A снижают связывание. В дополнение к остаткам, идентифицированным выше для всех FcR, дополнительные остатки IgG1, которые снижают связывание с рецептором IIIA Fc на 40% или более, представляют собой следующие: Ser239, Ser267 (только Gly), His268, Glu293, Gln295, Tyr296, Arg301, Val303, Lys338 и Asp376. Варианты, которые улучшают связывание с FcRIIA, включают T256A, K290A, S298A, E333A, K334A и A339T. Lys414 показал 40% снижение связывания с FcRIIA и FcRIIB, Arg416 показал 30% снижение связывания с FcRIIA и FcRIIA, Gln419 показал 30% снижение связывания с FcRIIA и 40% снижение связывания с FcRIIB, а Lys360 показал 23% улучшение связывания с FcRIIA. Смотри также Presta et al., (Biochem. Soc. Trans. 30:487-490, 2001), включенный в данный документ путем ссылки во всей полноте, который описывает несколько положений в Fc-участке IgG1, где обнаружено, что они улучшают связывание только со специфическими гамма-рецепторами (R) Fc или одновременно улучшают связывание с одним типом гамма рецепторов Fc и снижают связывание с другим типом. Отобранные варианты IgG1 с улучшенным связыванием с гамма-RIIA Fc, затем исследовали в *in vitro* анализе антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) и показали, что улучшение ADCC происходит тогда, когда используют мононуклеарные клетки периферической крови или природные килерные клетки.

Например, патент США № 6194551, включенный в данный документ во всей полноте путем ссылки, описывает варианты с измененной эффекторной функцией, содержащие мутации в участке Fc человеческого IgG в положениях аминокислот 329, 331 или 322 (с использованием номенклатуры Кэбата), некоторые из которых показали сниженное C1q связывание или активность CDC. В качестве другого примера, патент США № 6737056, включенный в данный документ во всей полноте путем ссылки, описывает варианты с измененным эффектором или связыванием гамма-рецептора Fc, содержащие мутации в участке Fc человеческого IgG Fc в положениях аминокислот 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439 (с использованием номенклатуры Кэбата), некоторые из которых показали профили связывания рецепторов, ассоциированные со сниженной активностью ADCC или CDC. Среди них мутации в положениях аминокислот 238, 265, 269, 270, 327 или 329 указывают на снижение связывания с FcRI, мутации в положениях аминокислот 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 или 439 указывают на снижение связывания с FcRII, а мутации в положениях аминокислот 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 или 437 указывают на снижение связывания с FcRIII.

Патент США № 5624821, включенный в данный документ во всей полноте путем ссылки, сообщает, что активность связывания C1q мышинового антитела можно изменить путем мутирования аминокислотных остатков 318, 320 или 322 тяжелой цепи и что замена остатка 297 (Asn) приводит к исчезновению литической активности.

Патентная публикация США № 20040132101, включенная в данный документ во всей полноте путем ссылки, описывает варианты с мутациями в положениях аминокислот 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 299, 313, 325, 328 или 332 (с использованием номенклатуры Кэбата) или положениях 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 или 332 (с использованием номенклатуры Кэбата), в которых мутации в положениях 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 или 332 могут снижать активность ADCC или снижать связывание с гамма-рецептором Fc.

Chappel et al. (Proc Natl Acad Sci USA. 88:9036-40 (1991)), включенный в данный документ во всей полноте путем ссылки, сообщает, что цитолитическая активность IgG1 является внутренним свойством домена CH2 его тяжелой цепи. Одноточечные мутации в любом аминокислотном остатке 234-237 IgG1 значительно снижают или уничтожают его активность. Требуется замещение всех остатков IgG1 234-237 (LLGG) в IgG2 и IgG4 для восстановления полной связывающей активности. Как замечено, антитело IgG2, содержащее всю последовательность ELLGGP (остатки 233-238), является менее активным, чем

IgG1 дикого типа.

Публикация Isaacs et al. (*J Immunol.* 161:3862-9 (1998)), включенная в данный документ во всей полноте путем ссылки, сообщает, что мутации в пределах мотива, особенно важного для связывания гамма-рецепторов Fc (глутамат 233 на пролин, лейцин/фенилаланин 234 на валин и лейцин 235 на аланин), полностью предотвращают истощение клеток-мишеней. Замена глутамата 318 аланином устраняет эффекторную функцию мышиного IgG2b, а также снижает силу человеческого IgG4.

Публикация Armour et al. (*Mol Immunol.* 40:585-93 (2003)), включенная в данный документ во всей полноте путем ссылки, идентифицировала варианты IgG1, которые реагируют с активирующим рецептором, гамма-рецептором RIIa Fc по меньшей мере в 10 раз менее эффективно, чем IgG1 дикого типа, но чье связывание с ингибиторным рецептором, гамма-рецептором RIIb Fc, только в четыре раза ниже. Мутации были осуществлены в участке аминокислот 233-236 и/или в положениях аминокислот 327, 330 и 331. Смотри также WO 99/58572, включенный в данный документ во всей полноте путем ссылки.

Публикация Xu et al. (*J Biol Chem.* 269:3469-74 (1994)), включенная в данный документ во всей полноте путем ссылки, сообщает, что замена Pro331 серином в IgG1 заметно снижает связывание C1q и фактически уничтожает литическую активность. В отличие от этого, замещение пролином Ser331 в IgG4 предоставило частичную литическую активность (40%) варианту Pro331 IgG4.

Публикация Schuurman et al. (*Mol Immunol.* 38:1-8 (2001)), включенная в данный документ во всей полноте путем ссылки, сообщает, что замена одного из цистеинов в шарнирной области, вовлеченных в образование связей внутри тяжелой цепи, Cys226, серином приводит к более стабильному связыванию внутри тяжелой цепи. Замена шарнирной последовательности Cys-Pro-Ser-Cys IgG4 шарнирной последовательностью Cys-Pro-Pro-Cys IgG1 также значительно стабилизирует ковалентное взаимодействие между тяжелыми цепями.

Публикация Angal et al. (*Mol Immunol.* 30:105-8 (1993)), включенная в данный документ во всей полноте путем ссылки, сообщает, что замена серина в аминокислотном положении 241 в IgG4 пролином (обнаруженного в этом положении у IgG1 и IgG2) ведет к получению гомогенного антитела, а также продлению времени полужизни и улучшению распределения в тканях по сравнению с оригинальным химерным IgG4.

Ковалентные модификации.

Ковалентные модификации антитела также включены в объем данного описания. Они могут осуществляться путем химического синтеза или ферментативного или химического расщепления антител, если необходимо. Другие типы ковалентных модификаций антител вводятся в молекулу путем реагирования целевых аминокислотных остатков антитела с органическим дериватирующим агентом, способным реагировать с выбранной боковой цепью или N- или C-концевыми остатками.

Цистеиновые остатки чаще всего реагируют с α -галоацетатами (и соответственными аминами), такими как хлорацетиловая кислота или хлорацетиламид, давая карбоксиметилловые или карбоксиамидометилловые производные. Цистеиновые остатки также получают реакцией с бромтрифторацетоном, α -бром- β -(5-имидазоил)пропионой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, p-хлорортутьбензоатом, 2-хлорортуть-4-нитро фенолом или хлоро-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

Гистидиновые остатки получают реакцией с диэтилпирокарбонатом при pH 5,5-7,0, поскольку этот агент является относительно специфическим для гистидиновой боковой цепи. Парабромфенацилбромид также полезен, реакцию преимущественно осуществляют в 0,1 М какодилате натрия при pH 6,0.

Лизиниловые и аминоконцевые остатки реагируют с ангидридами янтарной и других карбоксильных кислот. Дериватизация с этими агентами обладает эффектом реверсирования заряда лизиниловых остатков. Другие пригодные реагенты для дериватизации альфа-аминосодержащих остатков включают имидозиферы, такие как метилпиколинимидат, пиридоксальфосфат, пиридоксаль, хлороборогидрат, тринитробензолсульфоновую кислоту, O-метилизочевину, 2,4-пентандион и катализируемые трансаминазой реакции с глиоксалью.

Аргининовые остатки модифицируют реакцией с одним или несколькими стандартными реагентами, включая фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Дериватизация аргининовых остатков требует, чтобы реакцию проводили в щелочных условиях из-за высокого pKa гуанидиновой функциональной группы. Более того, эти реагенты могут реагировать с группами лизина, а также эпсилон-аминогруппой аргинина.

Можно осуществить специфическую модификацию тирозиловых остатков, особый интерес представляет введение спектральных меток в тирозиловые остатки, реакцией с ароматическими диазосоединениями или тетранитрометаном. Чаще всего, N-ацетилимидазол и тетранитрометан используют для образования O-ацетилтирозиловых видов и 3-нитропроизводных, соответственно. Тирозиловые остатки йодинизируют с использованием ^{125}I или ^{131}I для получения меченых белков для использования в радиоиммунологическом анализе.

Карбоксильные боковые группы (аспартил или глутанил) избирательно модифицируют реакцией с карбодиимидами (R-N.dbd.C.dbd.N-R'), где R и R' представляют собой разные алкильные группы, такими

как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азония-4,4-диметилфенил)карбодиимид. Более того, аспартиловые и глутамиловые остатки превращают в аспарагиновые и глутаминовые остатки реакцией с ионами аммония.

Глутаминовые и аспарагиновые остатки зачастую дезамидинируют до соответственных глутаминовых и аспартиловых остатков, соответственно. Эти остатки дезамидинируют в нейтральных и основных условиях. Дезамидинированная форма этих остатков охватывается объемом данного описания.

Другие модификации включают гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп сериловых или треониловых остатков, метилирование α -аминогрупп лизиновых, аргининовых и гистидиновых боковых цепей (Т. Е. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), ацетилирование N-концевого амина и амидирование C-концевой карбоксильной группы.

Другие типы ковалентной модификации включают химическое или ферментативное присоединение гликозидов к антителу. Эти процедуры выгодны тем, что они не требуют получения антитела в клетке-хозяине, которое обладает способностями к N- или O-связанному гликозилированию. В зависимости от использованного метода присоединения сахара можно присоединять к (a) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как у цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, таким как у серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, таким как у фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Эти методы описаны в WO87/05330 и у Aplin и Wriston, (*CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981)).

Удаление любого углеводного фрагмента, присутствующего на антителе, можно осуществить химически или ферментативно. Химическое дезгликозилирование требует подвергнуть антитело воздействию соединения трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Такая обработка приводит к отщеплению большинства или всех Сахаров, за исключением линкерного сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), тогда как выходящее антитело остается неповрежденным. Химическое дезгликозилирование описано Hakimuddin, et al., (*Arch. Biochem. Biophys.* 259: 52 (1987)) и Edge et al., (*Anal. Biochem.* 118: 131 (1981)). Ферментативного расщепления углеводных фрагментов на антителах можно достичь, используя разные эндо- и экзогликозидазы, как описано Thotakura et al., (*Meth. Enzymol.* 138: 350 (1987)).

Другие типы ковалентной модификации антитела включают соединение антитела с одним из множества небелковоподобных полимеров, например, полиэтиленгликолем, пропиленгликолем, полиоксиэтилированными полиолами, полиоксиэтилированным сорбитолом, полиоксиэтилированной глюкозой, полиоксиэтилированным глицерином, полиоксиалкиленами или полисахаридными полимерами, такими как декстран. Такие методы известны из уровня техники, смотри, например патенты США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192, 4179337, 4766106, 4179337, 4495285, 4609546 или EP 315456.

Производные.

Как указано выше, производное относится к полипептидам, химически модифицированным с помощью таких технологий как убиквитинирование, мечение (например, радионуклидами или различными ферментами), ковалентное полимерное присоединение, такое как ПЭГилирование (дериватизация с полиэтиленгликолем) и вставка или замещение путем химического синтеза аминокислот, таких как орнитин. Производные вещества антитела согласно изобретению, такого биспецифического антитела, также полезны в качестве терапевтических агентов и могут быть получены способами согласно данному документу.

Конъюгированный фрагмент можно ввести или присоединить к антителу либо ковалентно, либо через ионную, ван-дер-ваальсовую или водородную связь, например, ввести радиоактивные нуклеотиды или биотинилированные нуклеотиды, которые распознаются стрептавидином.

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) можно присоединять к веществам антител для обеспечения более длительного времени полужизни *in vivo*. Группа ПЭГ может иметь любой стандартный молекулярный вес и быть линейной или разветвленной. Средний молекулярный вес ПЭГ находится в диапазоне от приблизительно 2 килодальтон ("кДа") до приблизительно 100 кДа, более предпочтительно от приблизительно 5 кДа до приблизительно 50 кДа, еще более предпочтительно от приблизительно 5 кДа до приблизительно 10 кДа. Группы ПЭГ, как правило, присоединяются к веществам антител согласно описанию изобретения через ацилирование или восстановительное алкилирование природной или генно-инженерной реактивной группы на фрагменте ПЭГ (например, альдегидной, amino, тиольной или эфирной группы) с реактивной группой на веществе антитела (например, альдегидной, amino или эфирной группой). Добавление фрагментов ПЭГ к веществам антител можно осуществить с использованием технологий, хорошо известных из уровня техники. Смотри, например, международную публикацию № WO 96/11953 и патент США № 4 179 337.

Лигирование вещества антитела с помощью ПЭГ обычно происходит в водной фазе и его можно легко контролировать с помощью обращенно-фазовой аналитической ВЭЖХ. ПЭГилированные вещества очищают препаративно ВЭЖХ, а характеризуют с помощью аналитической ВЭЖХ, аминокислотного анализа и лазерной десорбционной масс-спектрометрии.

Конъюгаты антител.

Антитело можно вводить в его "нагой" или неконъюгированной форме, или конъюгировать косвенным путем к несущим полимерам, содержащим прочие подобные терапевтические или диагностические агенты. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела конъюгируют к цитотоксическому агенту, такому как химиотерапевтический агент, лекарственному средству, ингибитору роста, токсину (например, ферментативно активному токсину или бактериальному, грибковому, вирусному токсину или к токсину животного происхождения или их производным), или радиоактивному изотопу (то есть, радиокоњугату). Пригодные химиотерапевтические агенты включают: дауномицин, доксорубицин, метотрекат и виндезин (Rowland et al., (1986) выше). Пригодные токсины включают: бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин; растительные токсины, такие как рицин; низкомолекулярные токсины, такие как гелданамицин (Mandler et al. *J. Natl. Cancer Inst.* 92 (19) :1573-81 (2000); Mandler et al., *Bioorg. Med. Chem. Letters* 10:1025-1028 (2000); Mandler et al., *Bioconjugate Chem.* 13:786-91 (2002)), майтанзиноиды (EP 1391213; Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-23 (1996)), ауристатины (Doronina et al., *Nat. Biotech.* 21: 778-84 (2003) и калихимицин (Lode et al., *Cancer Res.* 58:2928 (1998); Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993)).

Антитела можно метить обнаруживаемыми метками с использованием радиоизотопов, аффинных меток (таких как биотин, авидин и т.п.), ферментных меток (таких как пероксидаза из хрена, щелочная фосфатаза и т.п.), флюоресцентных или люминисцентных меток (таких как FITC или родамин и т.п.), парамагнитных атомов и тому подобного. Процедуры выполнения такого мечения хорошо известны из уровня техники; например, смотри (Sternberger, L.A. et al., *J. Histochem. Cytochem.* 18:315 (1970); Bayer, E.A. et al., *Meth. Enzym.* 62:308 (1979); Engval, E. et al., *Immunol.* 109:129 (1972); Goding, J.W. *J. Immunol. Meth.* 13:215 (1976)).

Конъюгирование фрагментов антител описано в патенте США № 6306 393. Общие технологии также описаны у Shin et al., *Int. J. Cancer* 41:832-839 (1988); Shih et al., *Int. J. Cancer* 46:1101-1106 (1990); и Shih et al., патенте США № 5 057 313. Этот общий метод включает реагирование компонента антитела, имеющего окисленную углеводную часть, с полимером-носителем, который имеет по меньшей мере одну свободную аминную функцию и который нагружен рядом лекарств, токсинов, хелаторов, борных добавок или другим терапевтическим агентом. Эта реакция дает исходную связь шиффового основания (имина), которую можно стабилизировать восстановлением к вторичному амину для образования готового конъюгата.

Носитель-полимер может быть, например, аминокислотным или полипептидом по меньшей мере с 50 аминокислотными остатками. Из уровня техники известны разные технологии конъюгирования лекарственного средства или другого агента к полимеру-носителю. Полипептидный носитель можно использовать вместо аминокислотного, но пептидный носитель должен иметь по меньшей мере 50 аминокислотных остатков в цепи, предпочтительно 100-5000 аминокислотных остатков. По меньшей мере, несколько аминокислот должны быть лизиновыми остатками или глутаматными или аспартатными остатками. "Подвешенные амины" лизиновых остатков и "подвешенные карбоксилаты" глутамина и аспартата являются стандартными для присоединения лекарственного средства, токсина, иммуномодулятора, хелатора, борной добавки или другого терапевтического агента. Примеры пригодных полипептидных носителей включают полилизин, полиглутаминовую кислоту, полиаспарагиновую кислоту, их сополимеры и смешанные полимеры этих аминокислот и других, например, серинов, чтобы предоставить желательные свойства растворимости полученному загруженному носителю и конъюгату. Примеры агентов, с которыми антитело может конъюгировать, включают любые цитотоксичные или химиотерапевтические агенты, описанные в данном документе.

Альтернативно, конъюгированные антитела можно получить путем непосредственной конъюгации компонента антитела с терапевтическим агентом. Общая процедура аналогична косвенному методу конъюгации, за исключением того, что терапевтический агент непосредственно присоединяется к окисленному компоненту антитела. Например, углеводный фрагмент антитела можно присоединить к полиэтиленгликолю для продления времени полужизни.

Альтернативно, терапевтический агент можно присоединить у шарнирной области восстановленного компонента антитела путем образования дисульфидной связи или используя бифункциональный кросслинкер, такой как N-сукцинила 3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP). Yu et al., *Int. J. Cancer* 56:244 (1994). Общие технологии для такой конъюгации хорошо известны из уровня техники. Смотри, например, Wong, *Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking* (CRC Press 1991); Upešlacis et al., "Modification of antibodies by Chemical Methods," в *Monoclonal antibodies: Principles and Applications*, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," в *Monoclonal antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995). Из уровня техники известно множество бифункциональных протеиносвязывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), имиотиолан (ИТ), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCL), активные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(p-азидобензоил)гександиамин), бис-дiazониевые производные (такие как бис-(p-дiazониумбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуола 2,6-диизоцианат) и бис-

активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол).

Слитые с антителом белки.

Способы получения слитых с антителом белков хорошо известны из уровня техники. Смотри, например, патент США № 6 306 393. Слитые с антителом белки, содержащие фрагмент интерлейкина-2, описаны Boleti et al., *Ann. Oncol.* 6:945 (1995), Nicolet et al., *Cancer Gene Ther.* 2:161 (1995), Becker et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 93:7826 (1996), Hank et al., *Clin. Cancer Res.* 2:1951 (1996) и Hu et al., *Cancer Res.* 56:4998 (1996). Кроме того, Yang et al. (*Hum. Antibodies Hybridomas* 6:129 (1995)) описали слитый белок, который содержит фрагмент F(ab')₂ и фрагмент фактора некроза опухоли альфа. Дополнительные примеры слитых с антителом белков описаны Pastan et al., *Nat. Reviews Cancer* 6: 559-65 (2006).

Способы получения слитых с антителом и токсином белков, в которых рекомбинантная молекула содержит один или более компонентов антитела и токсин или химиотерапевтический агент, также известны специалистам в данной области техники. Например, слитые с антителом и псевдомонадным экзотоксином-A белки описаны Chaudhary et al., *Nature* 339:394 (1989), Brinkmann et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88:8616 (1991), Batra et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:5867 (1992), Friedman et al., *J. Immunol.* 150:3054 (1993), Wels et al., *Int. J. Can.* 60:137 (1995), Fominaya et al., *J. Biol. Chem.* 271:10560 (1996), Kuan et al., *Biochemistry* 35:2872 (1996) и Schmidt et al., *Int. J. Can.* 65:538 (1996). Слитые в антителом и токсином белки, содержащие фрагмент дифтерийного токсина, описаны Kreitman et al., *Leukemia* 7:553 (1993), Nicholls et al., *J. Biol. Chem.* 268:5302 (1993), Thompson et al., *J. Biol. Chem.* 270:28037 (1995) и Vallera et al., *Blood* 88:2342 (1996). Deonarain et al., *Tumor Targeting* 1:177 (1995) описали слитый с антителом и токсином белок, имеющий фрагмент РНКазы, тогда как Linardou et al., *Cell Biophys.* 24-25:243 (1994) получили слитый с антителом и токсином белок, содержащий компонент ДНКазы I. Гелонин использовали в качестве токсинового компонента в слитом с антителом и токсином белке, описанном Wang et al., *Abstracts of the 209th ACS National Meeting, Anaheim, Calif., Apr. 2-6, 1995, Part 1, BIOT005*. В качестве дополнительного примера, Dohlsten et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91:8945 (1994) сообщили о слитом с антителом и токсином белке, содержащем стафилококковый энтеротоксин-A.

Иллюстративными токсинами, которые пригодны для использования в получении таких слитых белков, являются рицин, абрин, рибонуклеаза, ДНКазы I, стафилококковый энтеротоксин-A, антивирусный белок фитолакки, гелонин, дифтерийный токсин, псевдомонадный экзотоксин и псевдомонадный эндотоксин. Смотри, например, Pastan et al., *Cell* 47:641 (1986) и Goldenberg, CA--A *Cancer Journal for Clinicians* 44:43 (1994). Другие пригодные токсины известны специалистам в данной области техники.

Антитела согласно настоящему описанию можно также использовать в ADEPT, конъюгируя антитело с активирующим пролекарством ферментом, который превращает пролекарство (например, пептидоловый химиотерапевтический агент, смотри WO 81/01145) в активное противораковое лекарственное средство. Смотри, например, WO 88/07378 и патент США № 4 975 278.

Ферментный компонент иммуноконъюгата, полезного для ADEPT, включает любой фермент, способный действовать на пролекарство таким образом, что превращает его в более активную цитотоксическую форму.

Ферменты, которые полезны в настоящем описании изобретения, включают щелочную фосфатазу, полезную для превращения фосфатосодержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; арилсульфатазу, полезную для превращения сульфатосодержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; цитозинную дезаминазу, полезную для превращения нетоксического 5-фторцитозина в противораковое лекарственное средство 5-фторурацил; протеазы, такие как серратиопроtease, термолизин, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (такие как катепсины B и L), полезные для превращения пептидосодержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; D-аланилкарбокси пептидазы, полезные для превращения пролекарств, содержащих заместители D-аминокислот; расщепляющие углеводы ферменты, такие как α -галактозидаза и нейраминидаза, полезные для превращения гликозилированных пролекарств в свободные лекарственные средства; β -лактамазу, полезную для превращения лекарств, дериватизированных с β -лактамами, в свободные лекарственные средства; и пенициллиновые амидазы, такие как пенициллин-V-амидаза или пенициллин-G-амидаза, полезные для превращения лекарств, дериватизированных у их аминного азота с феноксиацетиловой или фенилацетиловой группами, соответственно, в свободные лекарственные средства, но не ограничиваются ими. Альтернативно, антитела с ферментативной активностью, также известные из уровня техники как абзимы, можно использовать для превращения пролекарств согласно описанию изобретения в свободные лекарственные средства (смотри, например, Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987)). Конъюгаты антитела с абзимом можно получить, как описано в данном документе, для доставки абзима в популяцию опухолевых клеток.

Указанные выше абзимы можно ковалентно связывать с антителами с помощью технологий, хорошо известных из уровня техники, таких как использование гетеробифункциональных агентов, образующих поперечные связи, рассмотренных выше. Альтернативно, слитые белки, содержащие по меньшей мере антигенсвязывающий участок антитела согласно описанию изобретения, присоединенный по меньшей мере к функционально активной части фермента согласно описанию изобретения, можно полу-

чить, используя технологии рекомбинантных ДНК, хорошо известные из уровня техники (смотри, например, Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984)).

Рекомбинантное получение антител.

ДНК, кодирующую антитело согласно настоящему описанию, можно выделить и секвенировать, используя стандартные процедуры (например, используя олигонуклеотидные зонды, способные специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител). Обычно требуется клонирование ДНК или, предпочтительно, мРНК (то есть, кДНК), кодирующих антитела. Клонирование и секвенирование осуществляют с использованием стандартных технологий, таких как, например, полимеразная цепная реакция (ПЦР) (смотри, например, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press; Ausubel, et al. (Eds.), *Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1994)), которые включены в данный документ путем ссылки.

Реакции с нуклеотидными зондами и другие реакции нуклеотидной гибридизации осуществляют в условиях, позволяющих идентифицировать полинуклеотиды, которые гибридизируют друг с другом в заданных условиях. Одним примером набора условий являются следующие: жесткая гибридизация при 42°C в 50% формамиде, 5X SSC, 20 mM Na-PO₄, pH 6,8; и промывание в 1X SSC при 55°C в течение 30 минут. Формула для расчета эквивалентных условий гибридизации и/или выбора других условий для достижения желательного уровня жесткости хорошо известна из уровня техники. Из уровня техники известно, что условий эквивалентной жесткости можно достичь, изменяя температуру и буфер или солевую концентрацию, как описано Ausubel, et al. (Eds.), *Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1994), pp. 6.0.3 to 6.4.10. Модификации условий гибридизации можно определить эмпирически или точно рассчитать, исходя из длины зонда и процентного содержания спаривания оснований гуанозина/цитозина (GC). Условия гибридизации можно рассчитать, как описано у Sambrook, et al., (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1989), pp. 9.47 to 9.51.

Как использовано в данном документе, "выделенная" молекула нуклеиновой кислоты или "выделенная" последовательность нуклеиновых кислот является молекулой нуклеиновой кислоты, которую (1) идентифицировали и отделили от по меньшей мере одной контаминантной молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в природном источнике нуклеиновой кислоты, или (2) клонировали, амплифицировали, поместили или иным способом отличили от сопутствующих нуклеиновых кислот, чтобы можно было определить представляющую интерес последовательность нуклеиновых кислот, и считается выделенной. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается по форме или окружающей обстановке от той, что была обнаружена в природе. Выделенные молекулы нуклеиновых кислот, поэтому, отличаются от молекулы нуклеиновой кислоты, существующей в природных клетках. Однако, выделенная молекула нуклеиновой кислоты включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно экспрессируют антитело, где, например, молекула нуклеиновой кислоты находится в хромосомальном местоположении, отличающемся от местоположения в природных клетках.

Одним источником РНК, используемой для клонирования и секвенирования, является гибридома, продуцируемая путем получения В-клетки из трансгенной мыши и слияния В-клетки с клеткой, способной к неограниченной пролиферации. Преимущество использования гибридом состоит в том, что их можно легко "просеивать" и отбирать гибридому, продуцирующую представляющее интерес человеческое моноклональное антитело. Альтернативно, РНК можно выделить из В-клеток (или цельной селезенки) иммунизированного животного. Когда используют другой источник, а не гибридому, она может быть желательной для "просеивания" последовательностей, кодирующих иммуноглобулины или иммуноглобулиновые полипептиды с специфическими характеристиками связывания. Один метод такого скрининга используют в технологии фагового дисплея. Фаговый дисплей описан дополнительно в данном документе, а также хорошо известен из уровня техники. Смотри, например, Dower et al., WO 91/17271, McCafferty et al., WO 92/01047 и Caton and Koprowski, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-54 (1990)), каждый из которых включен в данный документ путем ссылки. В одном варианте осуществления изобретения, используя технологию фагового дисплея, выделяют кДНК из иммунизированной трансгенной мыши (например, общую селезеночную кДНК), полимеразную цепную реакцию используют для амплификации последовательностей кДНК, которые кодируют часть иммуноглобулинового полипептида, например, участки CDR, а амплифицированные последовательности вставляют в фаговый вектор. ДНК, кодирующие представляющие интерес пептиды, например, пептиды вариабельных участков с желательными характеристиками связывания, идентифицируют с помощью стандартных технологий, таких как пэннинг.

Обычно определена последовательность, кодирующая взятый в целом вариабельный участок иммуноглобулинового полипептида, однако, иногда она адекватна последовательности только части вариабельного участка, например, CDR-кодирующей части. Обычно часть последовательности составляет по меньшей мере 30 оснований в длину, чаще всего будут секвенироваться основания, кодирующие по меньшей мере одну треть или по меньшей мере половину длины вариабельного участка.

Секвенирование проводят, используя стандартные технологии (смотри, например, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, и Sanger, F. et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467, которые включены в данный документ путем ссылки). Путем

сравнения последовательности клонированной нуклеиновой кислоты с опубликованными последовательностями генов иммуноглобулинов человека и кДНК специалист в данной области в состоянии будет легко определить в зависимости от секвенированного участка (i) использование генного сегмента зародышевого типа иммуноглобулинового полипептида (включая изотип тяжелой цепи) и (ii) последовательность варибельного участка тяжелой и легкой цепей, включая последовательности, возникающие вследствие добавок N-участков и процесса соматической мутации. Одним из источников информации о последовательностях генов иммуноглобулинов является National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md.

Выделив ДНК, ее можно поместить в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи COS-клетки, человеческие эмбриональные 293-клетки почек (например, клетки 293E), клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые иным способом не продуцируют иммуноглобулиновый белок, для получения синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Рекомбинантное продуцирование антител хорошо известно из уровня техники.

Управляющие экспрессией последовательности относятся к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в отдельном организме-хозяине. Управляющие последовательности, пригодные для прокариот, например, включают промотор, необязательно операторную последовательность и сайт связывания рибосом. Эукариотические клетки, как известно, используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота является функционально связанной, когда она включена в функционально взаимодействие с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК предпоследовательности или секреторного лидера функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в качестве белка-предшественника, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; сайт связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он размещается таким образом, чтобы облегчить трансляцию. В целом, функционально связанный означает, что последовательности ДНК, будучи связанными, являются смежными, а в случае секреторного лидера - смежными и в фазе считывания. Однако, энхансеры не являются смежными. Связывание совершается путем сшивания в удобных сайтах рестрикции. Если такие сайты не существуют, то согласно обычной практике используются синтетические олигонуклеотидные адапторы или линкеры.

Клетка, клеточная линия или клеточная культура часто используются взаимозаменяемо и все такие обозначения в данном документе включают потомство. Трансформанты или трансформированные клетки включают полученные из первичных объектов клетки и культуры, независимо от количества переносов. Также известно, что не все потомство может быть точно идентичным по содержанию ДНК вследствие преднамеренных или ненамеренных мутаций. Включено мутантное потомство, обладающее той же функцией или биологической активностью, как и отобранные у первоначально трансформированной клетки. В случае, если предполагаются четкие обозначения, то это станет понятно из контекста.

В альтернативном варианте осуществления изобретения аминокислотную последовательность представляющего интерес иммуноглобулина можно определить с помощью непосредственного секвенирования белков.

Варианты аминокислотных последовательностей можно получить путем введения соответствующих нуклеотидных изменений в кодирующую ДНК или путем белкового синтеза. Такие варианты включают, например, делеции из и/или вставки в, и/или замещения остатков в аминокислотных последовательностях антител. Любую комбинацию делеции, вставки и замещения осуществляют для достижения конечного конструкта, если только конечный конструкт обладает желательными характеристиками. Изменения аминокислот также могут менять пост-трансляционные процессы молекулы, такие как изменение количества или положения сайтов гликозилирования.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей, получают с помощью множества методов, известных из уровня техники. Эти методы включают выделение из природного источника (в случае вариантов последовательностей аминокислот природного происхождения) или получение путем опосредованного олигонуклеотидами (или сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученного варианта или невариантной версии антитела, но не ограничиваются ими.

Настоящее описание также обеспечивает выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитела согласно описанию изобретения, необязательно функционально связанную с управляющей последовательностью, распознающей клетку-хозяина, векторы и клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты, и рекомбинантные технологии для продуцирования антител, которые могут включать культивирование клетки-хозяина для экспрессирования нуклеиновой кислоты, и, необязательно, извлечение антитела из культуры клетки-хозяина или культуральной среды. Различные системы и методы для получения антител рассмотрены Birch & Racher (*Adv. Drug Deliv. Rev.* 671-685 (2006)).

Для рекомбинантного получения антител нуклеиновую кислоту, кодирующую их, выделяют и вставляют в реплицируемый вектор для дополнительного клонирования (амплификация ДНК) или для

экспрессирования. ДНК, клонирующую моноклональное антитело, легко выделяют и секвенируют, используя стандартные процедуры (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела). Имеется много векторов. Векторные компоненты, как правило, включают одно или более из следующих: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или более селективных маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и терминирующую трансляцию последовательность, но не ограничиваются ими.

(1) Компонент сигнальной последовательности.

Антитела согласно настоящему описанию можно получить рекомбинантно, а не только непосредственно, но также в качестве слитого полипептида с гетерологичным полипептидом, который предпочтительно является сигнальной последовательностью или другим полипептидом, имеющим специальный сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Выбранная сигнальная последовательность предпочтительно является последовательностью, которая распознается и процессируется (то есть, расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Если прокариотическая клетка не распознает и не процессирует сигнальную последовательность нативного антитела, то сигнальную последовательность можно заменить сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы пектатлиазы (например, *pelB*) щелочной фосфатазы, пенициллиназы, *lpp* или лидеров термостабильного энтеротоксина II. Для дрожжевой секреции нативную сигнальную последовательность можно заменить, например, лидером дрожжевой инвертазы, лидером α -фактора (включая лидеры α -факторов *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*) или лидером кислой фосфатазы, лидером глюкоамилазы *C. albicans* или сигнальной последовательностью, описанной в WO90/13646. Для экспрессии в клетках млекопитающих имеются сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидеры, например, gD-сигнал герпетической лихорадки.

ДНК таких прекурсорных участков сшивают с ДНК, кодирующей антитело, в рамке считывания.

(2) Компонент точки начала репликации.

Векторы экспрессии и клонирования содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая позволяет вектору реплицироваться в одной или более выбранных клетках-хозяевах. Обычно, в клонирующем векторе эта последовательность является последовательностью, которая позволяет вектору реплицироваться независимо хромосомальную ДНК хозяина и содержит точки начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для ряда бактерий, дрожжей и вирусов. Точка начала репликации из плазмиды pBR322 пригодна для большинства грамотрицательных бактерий, точка начала репликации из плазмиды 2 μ пригодна для дрожжей, а разные вирусные точки начала репликации полезны для клонирующих векторов в клетках млекопитающих. В основном, компонент точки начала репликации не является необходимым для векторов экспрессии млекопитающих (точку начала репликации SV40 обычно используют только потому, что она содержит ранний промотор).

(3) Компонент селективного маркера.

Векторы экспрессии и клонирования могут содержать селективный ген, также названный селективным маркером. Обычные селективные гены кодируют белки, которые (а) придают резистентность к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату, тетрациклину, G418, гентицину, гистидинолу или микофеноловой кислоте, (b) возмещают ауксотрофный дефицит или (c) дополняют необходимые питательные вещества, недоступные из комплексной питательной среды, например, ген, кодирующий D-аланинрацемазу для *Bacilli*.

Один пример селекционной схемы использует лекарственное средство для задержания роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформировались гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственному средству, и таким образом переживают селекционный режим. Примеры таких доминантных селекций используют метотрексат, неомицин, гистидинол, пиромидин, микофеноловую кислоту и гидромицин.

Другим примером пригодных селекционных маркеров для клеток млекопитающих являются те, которые делают возможной идентификацию клеточного компонента для принятия кодирующей антитело нуклеиновой кислоты, такого как DHFR, тимидинкиназа, металлотионеин-I и -II, предпочтительно приатные гены металлотионеина, аденозиндезаминаза, орнитиндекарбоксилаза и так далее.

Например, клетки, трансформированные DHFR селекционным геном, первыми идентифицируются путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, содержащей метотрексат (Mtx) - конкурентный антагонист DHFR. Подходящей клеткой-хозяином, когда используют DHFR дикого типа, является овариальная клетка китайского хомячка (CHO), лишенная активности DHFR.

Альтернативно, клетки-хозяева (особенно хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или котрансформированные с последовательностями ДНК, кодирующими антитело согласно описанию изобретения, белок DHFR дикого типа и другие селекционные маркеры, такие как амногликозид 3'-фосфотрансфераза (APH), можно отбирать с помощью выращивания клеток на среде, содержащей селекционный агент для селекционного маркера, такой как амногликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. Смотри патент США № 4965199.

Пригодным селекционным геном для использования в дрожжах является ген *trp1*, присутствующий в дрожжевой плазмиде YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, 282: 39 (1979)). Ген *trp1* обеспечивает селекционный маркер для мутантного штамма дрожжей, лишенного возможности расти на триптофане, например, ATCC № 44076 или PEP4-1. Jones, (*Genetics* 85:12 (1977)). Наличие повреждения *trp1* в клеточном геноме дрожжей-хозяев к тому же обеспечивает эффективную среду для выявления трансформации путем выращивания в отсутствие триптофана. Подобным образом, штаммы дрожжей, лишенные *Leu2* (ATCC 20622 или 38626), дополняются известными плазмидами, несущими ген *Leu2*. Штаммы дрожжей, лишенные *Ura3*, дополняются плазмидами, несущими ген *ura3*.

Кроме того, векторы, полученные из 1,6 мкм кольцевой плазмиды pKD1, можно использовать для трансформирования дрожжей *Kluveromyces*. Альтернативно, о экспрессионной системе для крупномасштабного производства рекомбинантного телячьего химозина для *K. lactis* сообщил Van den Berg, (*Bio/Technology*, 8:135 (1990)). Также описаны стабильные векторы многокопийной экспрессии для секции зрелого рекомбинантного сывороточного альбумина с помощью производственных штаммов *Kluveromyces* (Fleer et al, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)).

(4) Промоторный компонент.

Векторы экспрессии и клонирования обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с кодирующей антитело нуклеиновой кислотой. Промоторы, пригодные для использования с прокариотическими хозяевами, включают арабинозный промотор (например, *araB*), промотор *rhoA*, β -лактамазные и лактозные промоторные системы, промоторную систему щелочной фосфатазы и триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как *tac*-промотор. Впрочем, пригодны другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для использования в бактериальных системах также будут содержать последовательность Шайна-Дальгарно (S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующей антитело согласно описанию.

Известны промоторные последовательности для эукариот. Фактически все эукариотические гены имеют богатый на АТ участок, расположенный приблизительно от 25 до 30 основания слева от сайта, где инициируется транскрипция. Другой последовательностью, обнаруженной от 70 до 80 основания слева от старта транскрипции большинства генов, является участок CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может быть сигналом для добавления хвоста полиадеиновой кислоты к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности соответственно вставляются в эукариотические векторы экспрессии.

Примеры пригодных промоторных последовательностей для использования с дрожжами-хозяевами включают промоторы для 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пуриватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкозоизомераза и глюкокиназа.

Другие дрожжевые промоторы, являющиеся индуцибельными промоторами, обладающими дополнительным преимуществом транскрипции, контролируемой условиями роста, представляют собой промоторные участки для алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома C, кислой фосфатазы, деградируемых ферментов, связанных с метаболизмом азота, металлотионеина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и ферментов, ответственных за использование мальтозы и галактозы. Пригодные векторы и промоторы для использования в дрожжевой экспрессии дополнительно описаны в EP 73,657. Дрожжевые энхансеры также выигрышно используются с дрожжевыми промоторами.

Транскрипция антител из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус лейкоза Абельсона, вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, более предпочтительно цитомегаловируса, ретровируса, вируса гепатита-B, обезьяньего вируса 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, актинового промотора или иммуноглобулинового промотора, из промоторов теплового шока, обеспечивая промоторы, совместимые с системами клетки-хозяина.

Ранний и поздний промоторы вируса SV40 беспрепятственно получают в качестве рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит SV40-вирусную точку начала репликации. Предранний промотор цитомегаловируса человека беспрепятственно получают в качестве рестрикционного фрагмента HindIII E. Система экспрессии ДНК в хозяевах-млекопитающих с использованием вируса папилломы крупного рогатого скота в качестве вектора описана в патенте США № 4419446. Модификация этих систем описана в патенте США № 4601978. Смотри также Reyes et al., *Nature* 297: 598-601 (1982) по поводу экспрессии кДНК β -интерферона человека в клетках мышей под контролем тимидинокиназного промотора из симплексного вируса герпеса. Альтернативно, в качестве промотора можно использовать длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

(5) Компонент энхансерного элемента.

Транскрипцию ДНК, кодирующих антитела согласно этому описанию, высшими эукариотами часто

повышают вставкой энхансерной последовательности в вектор. Известно много энхансерных последовательностей из генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин, альфа-фетопротеин и инсулин). Впрочем, обычно используют энхансер из вирусов эукариотических клеток. Примеры включают энхансер SV40 на позднем сайте точки начала репликации (п.о. 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, полиомный энхансер на позднем сайте точки начала репликации и аденовирусные энхансеры. См. также Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) по поводу усиливающих элементов для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть сплайсированным в вектор в положении 5' или 3' к антилокодирующей последовательности, но преимущественно располагается на сайте 5' от промотора.

(6) Компонент терминатора транскрипции.

Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжевых, грибковых, насекомых, растительных, животных, человеческих или ядродержащих клетках из других многоклеточных организмов), будут также содержать последовательности, необходимые для терминирования транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно наличествуют от 5' и изредка 3' нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные последовательности, транскрибированные как полиаденированные фрагменты в нетранслируемой части мРНК, кодирующей антитело. Одним используемым компонентом терминатора транскрипции является участок полиаденирования бычьего гормона роста. См. WO 94/11026, в которой раскрыт вектор экспрессии. Другим является терминатор транскрипции легкой цепи мышинного иммуноглобулина.

(7) Отбор и трансформация клеток-хозяев.

Пригодными клетками-хозяевами для клонирования и экспрессии ДНК в векторах согласно данному документу являются клетки прокариот, дрожжей и высших эукариот, описанных выше. Пригодные прокариоты для этой цели включают эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, *Enterobacteriaceae*, такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans* и *Shigella*, а также *Bacilli*, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis* (например, *B. licheniformis* 41 P, раскрытый в DD 266,710, опубликованной 12 апреля 1989), *Pseudomonas*, таких как *P. aeruginosa*, и *Streptomyces*. Одним преимущественным клонирующим *E. coli*-хозяином является *E. coli* 294 (ATCC 31446), хотя пригодными являются и другие штаммы, такие как *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31537) и *E. coli* W3110 (ATCC 27325). Эти примеры являются иллюстративными, а не ограничивающими.

Кроме прокариот пригодными клонирующими и экспрессирующими хозяевами для антилокодирующих векторов являются эукариотические микробы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи. *Saccharomyces cerevisiae* или обычные пекарские дрожжи чаще всего используют среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Впрочем, ряд других родов, видов и штаммов являются доступными и полезными для данного изобретения, таких как *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluveromyces*, таких как, например, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis*; и мицелиальные грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* и *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

Пригодные клетки-хозяева для экспрессирования гликозилированного антитела получают из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают растительные клетки и клетки насекомых. Идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы и варианты и соответствующие разрешенные клетки-хозяева насекомых, такие как *Spodoptera frugiperda* (гусеничные), *Aedes aegypti* (комариные), *Aedes albopictus* (комариные), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Общедоступным является ряд вирусных штаммов для трансфекции, например, вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм Bm-5 *Bombyx mori* NPV, такие вирусы можно использовать в данном изобретении согласно настоящему описанию, особенно для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperdas*.

Растительные клеточные культуры хлопчатника, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томатов, табака и других растительных клеток также можно использовать в качестве клеток-хозяев.

Примерами полезных клеточных линий-хозяев млекопитающих являются клетки яичников китайского хомячка, включая клетки CHO K1 (ATCC CCL61), DXB-11, DG-44, и клетки яичников китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); линия CV1 клеток почек обезьян, трансформированная с помощью SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); клетки почек человеческого эмбриона (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, (Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36: 59, 1977); клетки почки новорожденного хомяка (ВНК, ATCC CCL 10); мышинные клетки Сертоли (TM4, Mather, (*Biol. Reprod.* 23: 243-251, 1980); клетки почек обезьян (CV1 ATCC CCL 70); клетки почек африканских зеленых мартышек (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почек собак (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крыс линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мышей (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; и клеточ-

ная линия гепатомы человека (Нер G2).

Клетки-хозяева трансформируют или трансфицируют описанными выше векторами экспрессии или клонирования для получения антител и культивируют в стандартной питательной среде, модифицированной сообразно обстоятельствам для индуцирования промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих желательные последовательности. Кроме того, новые векторы и трансфицированные клеточные линии с многочисленными копиями транскрипционных единиц, разделенных с помощью селективного маркера, особенно полезны и предпочтительны для экспрессии антител, которые связывают мишень.

(8) Культивирование клеток-хозяев.

Клетки-хозяева, используемые для продуцирования антитела согласно этому описанию, можно культивировать в ряде сред. Доступные для приобретения среды, такие как среда Хэма F10 (Sigma), минимальная питательная среда ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная по способу Дульбекко среда Игла ((DMEM), Sigma), пригодны для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любую среду, описанную у Ham et al., (Meth. Enz. 58: 44, 1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980), патентах США № 4767704; 4657866; 4927762; 4560655 или 5122469; WO 90103430; WO 87/00195 или патенте США № 30985, можно использовать в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любую из этих сред можно дополнить по мере необходимости гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как гентамицин), микроэлементами (определенными как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечной концентрации в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки можно также включать в подходящих концентрациях, которые известны специалистам в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и подобное, являются теми, что изначально использовались для клеток-хозяев, выбранных для экспрессии, и будут очевидными для специалиста в данной области.

(9) Очистка антитела.

При использовании рекомбинантных технологий антитело продуцируется внутриклеточно в периплазматическом пространстве или непосредственно выделяется в среду, включая от микробных культур. Если антитело продуцируется внутриклеточно, для начала удаляют курпускулярный дебрис клеток-хозяев или лизированных фрагментов, например, центрифугированием или ультрафильтрацией. Better et al. (Science 240:1041-43, 1988; ICSU Short Reports 10:105 (1990); и Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:457-461 (1993) описывают процедуру выделения антител, которые выделились в периплазматическое пространство *E. coli*. [Смотри также, (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)].

Композицию антител, полученную из микробных клеток или клеток млекопитающих, можно очистить, используя, например, хроматографию с гидроксипатитом или ионообменную хроматографию и аффинную хроматографию, предпочтительной является технология очистки с аффинной хроматографией. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от видов и изоформ любого домена Fc иммуноглобулина, который присутствует у антитела. Белок А можно использовать для очистки антител, которые базируются на $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ тяжелых цепях человека (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13, 1983). Белок G рекомендуют для всех мышинных изоформ и для человеческого $\gamma 3$ (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). Матриксом, к которому аффинный лиганд присоединяется, чаще всего является агароза, но пригодны и другие матриксы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, создают возможность для быстрых скоростей тока жидкости и наименьшего времени обработки, чем можно достичь с агарозой. Когда антитело содержит домен CN 3, то для очистки пригодна смола Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Другие технологии очистки белков, такие как фракционирование на ионообменной колонке, преципитация этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на кремнеземе, хроматография на гепарине SEPHAROSE®, хроматография на анионообменной или катионообменной смоле (такая как на колонке с полиаспартовой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и преципитация с сульфатом аммония также пригодны, в зависимости от антитела, которое извлекается.

Методы скрининга.

Эффективные терапевтические средства зависят от идентификации эффективных агентов, лишенных значительной токсичности. Антитела можно отбирать на предмет аффинности связывания с помощью хорошо известных из уровня техники методов. Можно использовать, например, анализ на подвижность в геле, вестерн-блоттинг, конкурентный анализ с использованием радиоактивной метки, совместное фракционирование с помощью хроматографии, совместная преципитация, поперечное сшивание, ELISA и подобные, которые описаны в, например, Current Protocols in Molecular Biology (1999) John Wiley & Sons, NY, который включен в данный документ во всей полноте путем ссылки.

В одном варианте осуществления изобретения согласно настоящему описанию, способы скрининга антител, которые модулируют активность антигена-мишени, включают контактирование исследуемых антител с полипептидом-мишенью и определение наличия комплекса между антителом и лигандом-

мишенью. В таких анализах лиганд обычно метят. После соответствующей инкубации свободный лиганд отделяют от того, который присутствует в связанной форме, а количество свободных или незакомплексованных меток является мерилем способности отдельного антитела связываться с лигандом-мишенью.

В другом варианте осуществления изобретения согласно настоящему описанию используют скрининг с высокой пропускной способностью для фрагментов антител или CDR, обладающих пригодной аффинностью связывания с полипептидом-мишенью. Кратко, большое количество разных низкомолекулярных белковых пробных соединений синтезируют на твердом субстрате. Пробные белки антител контактируют с полипептидом-мишенью и промываются. Связанные полипептиды затем выявляют с помощью методов, известных из уровня техники. Очищенные антитела согласно описанию изобретения можно также покрывать непосредственно на планшете для использования в указанных выше лекарственных скрининговых методах. Кроме того, ненейтрализующие антитела можно использовать для захвата мишени и ее иммобилизации на твердой подложке.

Методы оценки нейтрализующей биологической активности антител TGF β 1 и анти-TGF β антител известны из уровня техники. См. например, патент США 7 867 496. Примеры *in vitro* биоанализов включают: (1) индуцирование образования колоний клеток NRK на мягком агаре в присутствии EGF (Roberts et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:5339-5343); (2) индуцирование дифференцировки примитивных мезенхимальных клеток для экспрессирования хрящевидного фенотипа (Seyedin et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:2267-2271); (3) ингибирование роста эпителиальных клеток Mv1Lu легких норки (Danielpour et al. (1989) J. Cell. Physiol., 138:79-86) и клеток BBC-1 почек обезьян (Holley et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5989-5992); (4) ингибирование митогенеза мышечных тимоцитов C3H/HeJ (Wrann et al. (1987) EMBO J., 6:1633-1636); (5) ингибирование дифференцировки миобластных клеток L6 крыс (Florini et al. (1986) J. Biol. Chem., 261:16509-16513); (6) измерение продукции фибронектина (Wrana et al. (1992) Cell, 71:1003-1014); (7) индуцирование промотора ингибитора активатора плазминогена I (PAI-1), слитого с люциферазным геном-репортером (Abe et al. (1994) Anal. Biochem., 216:276-284); (8) твердофазный иммуоферментный анализ с флуоресцентным усилением (Danielpour et al. (1989) Growth Factors, 2:61-71); и (9) клеточный анализ, описанный у Singh et al. (2003) Bioorg. Med. Chem. Lett., 13 (24):4355-4359.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нейтрализация антителом TGF β 1 и TGF β 2 является по меньшей мере в 2-50 раз, 10-100 раз, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 25 раз, 50 раз или 100 раз или на 20-50%, 50-100%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% более сильной, чем нейтрализация TGF β 3.

Дополнительные способы оценки биологической активности и нейтрализации TGF β (например, антителами к TGF β) предусмотрены в Примерах. Например, нейтрализацию можно измерить с помощью анализа нейтрализации и выразить как значение IC₅₀. Значение IC₅₀ можно рассчитать для заданной молекулы путем определения концентрации молекул, необходимых чтобы вызвать половинное ингибирование максимума биологического ответа другой молекулы или клеточной активности. Чем ниже IC₅₀, тем больше сила молекулы ингибировать желательную белковую активность. Примеры анализов нейтрализации, рассмотренные в данном документе, включают анализ секреции интерлейкина-11, анализ пролиферации клеток HT-2/IL-4, но не ограничиваются ими. Кроме того, анализ активности TGF β можно проводить для определения того, ингибирует ли антитело преимущественно одну изоформу TGF β , включая анализ фосфорилирования pSMAD или анализ связывания ghLAP. В дополнительном варианте осуществления изобретения антитело имеет более низкое IC₅₀ (то есть, лучшее связывание, большую силу) для TGF β 1 и TGF β 2 по сравнению с TGF β 3.

Комбинированная терапия.

В одном варианте осуществления изобретения, антитело согласно настоящему описанию вводят со вторым агентом, полезным для лечения заболевания или нарушения, как описано в данном документе. Если идентифицировано более чем одно антитело, эффективное для связывания с антигеном-мишенью, то предусматривается, что можно смешать два или более антител к разным эпитопам антигена-мишени и/или которые связывают предпочтительнее разные изоформы TGF β , вследствие чего комбинация антител вместе обеспечит еще лучшую эффективность против болезненного состояния или нарушения, связанных с полипептидом-мишенью. Композиции, содержащие одно или более антител согласно изобретению можно вводить людям или млекопитающим, страдающим от состояния или нарушения, которые будут лечиться и связанные с полипептидом-мишенью.

Одновременное введение двух терапевтических агентов не требует, чтобы агенты вводили в одно время или одним и тем же путем, при условии, что имеет место перекрывание периодов времени, в течение которых агенты проявляют свой терапевтический эффект. Одновременное или последовательное введение предусматривается для введения в различные дни или недели.

Второй агент может быть другим терапевтическим агентом, таким как цитокины, факторы роста, антитела к другим антигенам-мишеням, противовоспалительными агентами, противосвертывающими агентами, агентами, которые ингибируют продуцирование внеклеточного матрикса, агентами, которые понижают или повышают кровяное давление, агентами, которые снижают холестерин, триглицериды,

LDL, VLDL или липопротеины или повышают HDL, агентами, которые повышают или снижают уровни регулирующих холестерин белков, противоопухолевыми препаратами или молекулами. Для пациентов с гиперпролиферативным нарушением, таким как рак или опухоль, также предусмотрено комбинирование с другими терапевтическими способами воздействия, такими как лучевая терапия, химиотерапия, фотодинамическая терапия или хирургическое вмешательство.

Предполагается, что антитело согласно настоящему описанию и второй агент могут даваться одновременно в одной фармацевтической форме. Дополнительно предполагается, что агенты будут вводиться в отдельных фармацевтических формах и в пределах 30 минут по отношению друг к другу.

В другом аспекте, второй агент вводят перед введением композиции антитела. Предшествующее введение относится к введению второго агента в пределах интервала от одной недели перед лечением антителом и вплоть до 30 минут после введения антитела. Дополнительно предполагается, что второй агент вводят вслед за введением композиции антитела. Последовательное введение направлено на введение от 30 минут после лечения антителом и вплоть до одной недели после введения антитела.

Дополнительно предполагается, что при необходимости можно вводить другие вспомогательные терапии. Например, пациенту при необходимости также можно вводить белок, который деградирует внеклеточный матрикс, цитотоксический агент, проводить хирургическое лечение, химиотерапию или лучевую терапию.

Дополнительно предполагается, что когда антитело вводят в комбинации с другим агентом, таким как, например, цитокин или фактор роста, или химиотерапевтический агент, то введение также включает использование радиотерапевтического агента или лучевой терапии. Лучевую терапию вводят в комбинации с композицией антитела, как определено лечащим врачом и в дозах, обычно даваемых пациентам, проходящим лечение рака.

Цитотоксический агент относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функцию клеток и/или вызывает деструкцию клеток. Термин предназначен включать радиоактивные изотопы (например, I131, I125, Y90 и Re186), химиотерапевтические агенты и токсины, такие как ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или синтетические токсины или их фрагменты. Нецитотоксические агенты относятся к веществам, которые не ингибируют или предотвращают функцию клеток и/или не вызывают деструкцию клеток. Нецитотоксические агенты могут включать агент, который при активации может быть цитотоксическим. Нецитотоксический агент может включать гранулы, липосомы, матриксы или частицы (смотри, например, патентные публикации США 2003/0028071 и 2003/0032995, которые включены в данный документ путем ссылки). Такие агенты могут быть конъюгированными, сцепленными, соединенными или связанными с антителом согласно описанию.

Химиотерапевтические агенты, предусмотренные для использования с антителами согласно настоящему описанию, включают агенты, перечисленные в табл. 1, но не ограничиваются ими.

Таблица 1

<u>Алкилирующие агенты</u>	<u>Натуральные продукты</u>
<u>азотистый иприт</u>	<u>антимитотические средства</u>
хлорметин	
циклофосфамид	<u>Таксаны</u>
ифосфамид	паклитаксель
мелфалан	алкалоиды барвинка
хлорамбуцил	винбластин (VLB)
	винкристин
<u>нитрозомочевины</u>	винорелбин
кармустин (BCNU)	Таксотер® (доцетаксель)
ломустин (CCNU)	эстамустин
семустин (метил-CCNU)	эстамустина фосфат
<u>этиленимин/метилмеламин</u>	<u>Эпиподофилотоксины</u>
триэтиленмеламин (ТЕМ)	этопозид
триэтилентиофосфорамида (тиотепа)	тенипозид
гексаметилмеламин (НММ, алтретамин)	
	<u>Антибиотики</u>
<u>Алкилсульфонаты</u>	актиномицин D
бусульфан	дауномицин (рубидомицин)
	доксорубицин (адриамицин)
<u>Триазины</u>	митоксантронеидарубицин
дакарбазин (DTIC)	блеомицин
	спликамицин (митрамицин)
<u>Антиметаболиты</u>	митомицин С
<u>Аналоги фолиевой к-ты</u>	дактиномицин
метотрексат	афидиколин
Триметрексат	
Пеметрексат (многонаправленный антифолат)	<u>Ферменты</u>
	L-аспарагиназа
<u>Аналоги пириимидина</u>	L-аргиназа
	<u>Радиосенсибилизаторы</u>

5-фторурацил	метронидазол
фтордезоксифуридин	мизонидазол
гемцитабин	десметилмизонидазол
цитозина арабинозид (AraC, цитарабин)	пимонидазол
5-азациитидин	этанидазол
2,2'-дифтордезоксифуридин	ниморазол
	RSU 1069
	EO9
<u>Аналоги пурина</u>	RB 6145
6-меркаптопурин	SR4233
6-тиогуанин	никотинамид
азатиоприн	5-бромдезоксифуридин
2'-дезоксифуридин	5-йоддезоксифуридин
(пентостатин)	бромдезоксифуридин
эритрогидроксинониладенин (ENNA)	
фосфат флударабина	<u>Прочие агенты</u>
2-хлордезоксифуридин (кладрибин, 2-CdA)	<u>Координационные комплексы</u>
	<u>платины</u>
<u>Тип I ингибиторов топоизомеразы</u>	цисплатин
кампотецин	Карбоплатин
топотекан	оксалиплатин
иринотекан	антрацендион
	митаксантрон
<u>Модификаторы биологического отклика</u>	<u>Замещенная мочевина</u>
G-CSF	гидроксимочевина
GM-CSF	<u>Производные метилгидразина</u>
	N-метилгидразин (MHN)
<u>Агенты дифференцировки</u>	прокарбазин
производные ретиноевой к-ты	<u>Адренокортикальные супрессоры</u>
<u>Гормоны и антагонисты</u>	митотан (o,p'-DDD)
<u>Адренокортикостероиды/</u>	айноглутетимид

<u>антагонисты</u> преднизон и эквиваленты дексаметазон аиноглютетимид <u>Прогестины</u> гидроксипрогестерона капроат медроксипрогестерона ацетат мегестрол ацетат <u>Эстрогены</u> диэтилстилбестрол этинилэстрадиол/эквиваленты <u>Антиэстроген</u> тамоксифен <u>Андрогены</u> тестостеронпропионат флуоксиместерон/эквиваленты <u>Антиандрогены</u> флутамид аналоги гонадотропин- высвобождающего гормона лейпролид <u>Нестероидные антиандрогены</u> флутамид	<u>Цитокины</u> интерферон (α , β , γ) интерлейкин-2 <u>Фотосенсибилизаторы</u> производные гематопорфирина Фотофрин® производные бензопорфирина Нреб этиопорфирин олова (SnET2) феоборид-а бактериохлорофилл-а нафталоцианины фталоциантины фталоциантины цинка <u>Ионизирующее излучение</u> рентгеновы лучи ультрафиолетовое излучение гамма-излучение излучение в видимой области спектра инфракрасное излучение микроволновое излучение
---	---

Также предполагается, что второй агент является противofiброзным агентом. Примеры антифиброзных агентов включают другие агенты, которые снижают активность трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) (включая GC-1008 (Genzyme/Medimmune); лерделимуаб (CAT-152; Trabio, Cambridge Antibody); метилимуаб (CAT-192, Cambridge Antibody,); LY-2157299 (Eli Lilly); ACU-HTR-028 (Opko Health), но не ограничиваясь ими), включая антитела, которые нацелены на одну или более изоформ TGF- β , ингибиторы киназного рецептора TGF- β TGFBR1 (ALK5) и TGFBR2 и модуляторы пострецепторных сигнальных путей; ингибиторы активации сигнальных путей хемокиновых рецепторов; антагонисты рецепторов эндотелина, включая ингибиторы, которые нацелены на рецепторы эндотелина А и В, и те, которые селективно нацелены на рецептор эндотелина А (включая амбрисентан; авосентан; босентан; класосентан; дарусентан; BQ-153; FR-139317, L-744453; макитентан; PD-145065; PD-156252; PD163610; PS-433540; S-0139; ситаксентан натрия; TBC-3711; зиботентан, но не ограничиваясь ими); агенты, которые снижают активность фактора роста соединительной ткани (CTGF) (включая FG-3019, FibroGen, но не ограничиваясь ими), а также включая другие CTGF-нейтрализующие антитела; ингибиторы матричной металлопротеиназы (MMP) (включая MMP1-12, PUP-1 и тигатопидтрифлутат, но не ограничиваясь ими); агенты, которые снижают активность рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), включая эрлотиниб, gefитиниб, BMS-690514, цетуксимаб, но не ограничиваясь ими, антитела, нацеленные на рецептор EGF, ингибиторы киназного рецептора EGF и модуляторы пострецепторных

сигнальных путей; агенты, которые снижают активность фактора роста тромбоцитов (PDGF) (включая иматиниба мезилат (Novartis), но не ограничиваясь им), а также включая нейтрализующие PDGF антитела, антитела, нацеленные на рецептор PDGF (PDGFR), ингибиторы PDGFR-киназной активности и пострецепторных сигнальных путей; агенты, которые снижают активность фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (включая акситиниб, бевацизумаб, BIBF-1120, CDP-791, CT-322, IMC-18F1, PTC-299, и рамуцирамаб, но не ограничиваясь ими), а также включая нейтрализующие VEGF антитела, антитела, нацеленные на рецептор 1 VEGF (VEGFR1, Flt-1 рецептор 2 VEGF (VEGFR2, KDR), растворимую форму VEGFR1 (sFlt), и их производные, которые нейтрализуют VEGF, и ингибиторы активности киназного рецептора VEGF; ингибиторы ряда киназных рецепторов, таких как BIBF-1120, который ингибирует киназные рецепторы фактора роста эндотелия сосудов, фактора роста фибробластов и фактора роста тромбоцитов; агенты, которые препятствуют функции интегрина (включая STX-100 и IMGN-388, но не ограничиваясь ими), а также включая нацеленные на интегрин антитела; агенты, которые препятствуют профибротической активности IL-4 (включая AER-001, AMG-317, APG-201 и sIL-4R α , но не ограничиваясь ими) и IL-13 (включая AER-001, AMG-317, анрукинзумаб, CAT-354, цинтредекина бесудотокс, МК-6105, QAX-576, SB-313, SL-102 и TNX-650, но не ограничиваясь ими), а также включая нейтрализующие антитела к любому цитокину, антитела, нацеленные на рецептор IL-4 или рецептор IL-13, растворимую форму рецептора IL-4, или их производные, которые, как сообщают, связывают и нейтрализуют IL-4 и IL-13, химерные белки, включая весь или часть IL-13, и токсины, особенно экзотоксин синегнойной палочки, передающий сигнал через JAK-СТАТ-киназный путь; агенты, которые препятствуют эпителиально-мезенхимальному переходу, включая ингибиторы mTog (включая AP-23573, но не ограничиваясь им); агенты, которые снижают уровни меди, такие как тетраиомолибдат; агенты, которые снижают окислительный стресс, включая N-ацетилцистеин и тетраиомолибдат; и интерферон гамма, но не ограничиваются перечисленными. Также предусмотрены агенты, которые являются ингибиторами фосфодиэстеразы 4 (PDE4) (включая рофлумиласт, но не ограничиваясь им); ингибиторами фосфодиэстеразы 5 (PDE5) (включая мироденафил, PF-4480682, цитрат силденафила, SLx-2101, тадалафил, уденафил, UK-369003, варденафил изапринаст, но не ограничиваясь ими); или модификаторами метаболического пути арахидоновой кислоты, включая ингибиторы циклооксигеназы и 5-липоксигеназы (включая zileитон, но не ограничиваясь им). Дополнительно предусмотренными являются соединения, которые снижают ремоделирование тканей или фиброз, включая ингибиторы пролилгидролазы (включая 1016548, CG-0089, FG-2216, FG-4497, FG-5615, FG-6513, фибростатин А (Takeda), луфиронил, P-1894B и сафиронил, но не ограничиваясь ими), и агонисты рецептора-гамма, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR) (включая пиоглитазон и росиглитазон, но не ограничиваясь ими).

Другие предусмотренные специфические антифибротические агенты включают релаксин, пирфенидон, уфиронил, сурифонил, CAT-192, CAT-158; амбресентан, телин; FG-3019, антитело к CTGF; анти-EGFR антитело; ингибитор киназы EGFR; тарцева; gefитиниб; антитело к PDGF, ингибитор киназы PDGFR; глибек; BIBF-1120, VEGF, FGF и ингибитор рецептора PDGF; антиинтегриновое антитело; антитело к IL-4; тетраиомолибдат, медный хелатирующий агент; гамма-интерферон; NAC, цистеиновое пролекарство; фактор роста гепатоцитов (HGF); KGF; блокаторы рецептора ангиотензина, ингибиторы ACE, ингибиторы ренина; ингибиторы COX и LO; zileuton; монтелеукаст; авастин; статины; ингибиторы PDE5, такие как силденафил, уденафил, тадалафил, варденафил или запринаст; рофлумиласт; этанерцепт (Enbrel); прокаогулянт; простагландины, такие как PGE2, PRX-08066, антагонисты рецептора 5HT2B; синтредекина бесудотокс, химерный человеческий IL13, конъюгированный с генно-инженерным экзотоксином синегнойной палочки; рофлумиласт, ингибитор PDE4; FG-3019, человеческое моноклональное антитело против фактора роста соединительной ткани; GC-1008, человеческое моноклональное антитело к TGF- β ; трепростинил, аналог простаглицлина; интерферон- α ; QAX-576, модулятор IL13; WEB 2086, агонист рецептора PAF; иматиниба мезилат; FG-1019; сурамин; босентан; IFN-1b; анти-IL-4; анти-IL-13; таурин, ниацин, NF-кВ антисмысловые олигонуклеотиды; ингибиторы синтазы оксида азота.

Лечение нарушений.

В другом варианте осуществления изобретения, настоящее описание предусматривает способ ингибирования намеченной активности путем введения мишенеспецифического антитела пациенту, нуждающемуся в этом. Любой тип антител, описанных в данном документе, можно использовать терапевтически. В примерах осуществления изобретения, мишенеспецифическое антитело является человеческим, химерным или гуманизированным антителом. В другом примере осуществления изобретения мишенью является человек и пациентом является человек. Альтернативно, пациентом может быть млекопитающее, которое экспрессирует белок-мишень, с которым специфическое антитело дает перекрестную реакцию. Антитело можно вводить нечеловеческому млекопитающему, экспрессирующему белок-мишень, с которым специфическое антитело дает перекрестную реакцию (то есть, примату), для ветеринарных целей или в качестве экспериментальной модели болезни человека. Такие экспериментальные модели болезни могут быть полезными для оценки терапевтической эффективности мишенеспецифических антител согласно описанию изобретения.

В одном варианте осуществления изобретения, описание предусматривает способ лечения состоя-

ния или нарушения, связанного с экспрессией TGF- β , включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, как описано в данном документе.

Примеры состояний или нарушений, связанных с экспрессией TGF β , которые можно лечить веществом антитела, которое связывает TGF β (например, антитела согласно настоящему описанию), включают рак, такой как рак легких, рак простаты, рак молочной железы, гепатоцеллюлярный рак, рак пищевода, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак почек, овариальный рак, рак желудка, фиброзный рак, глиому и меланому, глазные (например, окулярные, оптические, офтальмические или офтальмологические) заболевания, состояния или нарушения, заболевания, состояния или нарушения, связанные с фиброзом, например, фибропролиферативные заболевания, состояния или нарушения, или заболевания, состояния или нарушения, имеющие связанный фиброз.

Фибропролиферативные заболевания, состояния или нарушения или заболевания, имеющие связанный фиброз, включают те, которые поражают любой орган или ткань в организме, включая кожу, легкие, почки, сердце, головной мозг и глаза, но не ограничиваются ими. Фибропролиферативные заболевания, состояния или нарушения, или заболевания, имеющие связанный фиброз, включают фиброз легких, идиопатический фиброз легких, перибронхиолярный фиброз, интерстициальный фиброз легких, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), заболевание малых дыхательных путей (например, обструктивный бронхолит), эмфизему, развитой или острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), острое повреждение легких (ALI), фиброз легких, обусловленный инфекционными или токсическими агентами, фиброз почек, гломерулонефрит (GN) всех этиологий, например, мезенгиальнопролиферативный GN, иммунный GN и суставной GN, гломерулосклероз, тубулоинтерстициальное повреждение, почечный интерстициальный фиброз, почечный фиброз и все причины почечного интерстициального фиброза, почечный фиброз, вызванный осложнениями вследствие приема лекарств, включая циклоспориновую терапию трансплантатных реципиентов, например лечение циклоспорином, ВИЧ-ассоциированную нефропатию, отмирание трансплантата, диабетическое заболевание почек (например, диабетическую нефропатию), нефрогенный системный фиброз, диабет, идиопатический ретроперитонеальный фиброз, склеродерму, фиброз печени, заболевания печени, связанные с избыточным рубцеванием и прогрессирующим склерозом, включая цирроз печени всех этиологий, нарушения билиарного дерева, нарушение функции печени, приписываемое инфекциям, кистозно-фиброзные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, такие как застойная сердечная недостаточность; дилатационная кардиомиопатия, миокардит, васкулярный стеноз, кардиальный фиброз (например, послеинфарктный кардиальный фиброз), постмиокардитический инфаркт, гипертрофия левого желудочка, веноокклюзионное заболевание, рестеноз (например, рестеноз после ангиопластики), артериовенозную трансплантационную недостаточность, атеросклероз, гипертонию, гипертоническую болезнь сердца, гипертрофию сердца, гипертрофическую кардиомиопатию, сердечную недостаточность, заболевание аорты, прогрессирующий системный склероз, полимиозит, системную красную волчанку, дерматомиозит, фасцит, синдром Рейно, ревматоидный артрит, пролиферативную витреоретинопатию, витреоретинопатию любой этиологии или фиброз, связанный с глазной хирургией, такой как лечение глаукомы, реплантация сетчатки, удаление катаракты, или дренажными процедурами любого вида, рубцевание в роговице и конъюнктиве, фиброз в эндотелии роговицы, щелочной ожог (например, щелочной ожог до роговицы), фиброз капсулы хрусталика после операции на катаракте, чрезмерное рубцевание в тканях вокруг расположенных вне глаз мышц при хирургическом лечении косоглазия, переднюю подкапсулярную катаракту и заднее подкапсулярное помутнение, переднесеgmentарное фиброзное заболевание глаз, фиброз роговичной стромы (например, связанный с помутнением роговицы), фиброз трабекулярной сетки (например, связанный с глаукомой), заднесеgmentарное фиброзное заболевание глаз, фиброваскулярное рубцевание (например, в сосудистой или хороидальной васкулатуре глаз), фиброз сетчатки, эпиретинальный фиброз, ретинальный глиоз, субретинальный фиброз (например, связанный с возрастной макулярной дегенерацией), постретинальную хирургию и антиглаукомную операцию, тракционное отслоение сетчатки в ассоциации с сужением ткани при диабетической ретинопатии, болезнь Пейрони, системный склероз, постспинальное кордовое повреждение, остеопороз, болезнь Камурати-Энгельманна, болезнь Крона, рубцевание, синдром Марфана, синдром истощения яичников, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, фиброз вследствие хирургических иссечений механической травмы, фиброз, связанный с глазной хирургией, и чрезмерное или гипертрофическое образование рубцов и келоидов на коже вследствие заживления ран, возникших в результате травм и хирургических повреждений, но не ограничиваются ими.

Примеры глазных заболеваний (например, окулярных, оптических, офтальмических или офтальмологических заболеваний), состояний или нарушений включают фибропролиферативные нарушения, фиброз глаз, офтальмический фиброз, дисфункцию сетчатки, фиброз, связанный с дисфункцией сетчатки, влажную или сухую макулярную дегенерацию, пролиферативную витреоретинопатию, витреоретинопатию любой этиологии, фиброз, связанный с глазной хирургией, такой как лечение глаукомы, реплантация сетчатки, удаление катаракты, или дренажными процедурами любого вида, рубцевание в роговице и конъюнктиве, фиброз в эндотелии роговицы, щелочной ожог (например, щелочной ожог до ро-

говицы), фиброз капсулы хрусталика после операции на катаракте, чрезмерное рубцевание в тканях вокруг расположенных вне глаз мышц при хирургическом лечении косоглазия, переднюю подкапсулярную катаракту и заднее подкапсулярное помутнение, переднесеgmentарное фиброзное заболевание глаз, фиброз роговичной стромы (например, связанный с помутнением роговицы), фиброз трабекулярной сетки (например, связанный с глаукомой), заднесеgmentарное фиброзное заболевание глаз, фиброваскулярное рубцевание (например, в сосудистой или хороидальной васкулатуре глаз), фиброз сетчатки, эпиретинальный фиброз, ретинальный глиоз, субретинальный фиброз (например, связанный с возрастной макулярной дегенерацией), фиброз, связанный с постретинальной хирургией и операцией на глаукоме, тракционное отслоение сетчатки в ассоциации с сужением ткани при диабетической ретинопатии, но не ограничиваются ими.

Примеры фибропролиферативных глазных заболеваний, состояний или нарушений, фиброза глаз, окулярного фиброза или офтальмического фиброза включают пролиферативную витреоретинопатию, витреоретинопатию любой этиологии, фиброз, связанный с дисфункцией сетчатки, фиброз, связанный с влажной или сухой макулярной дегенерацией, фиброз, связанный с глазной хирургией, такой как лечение глаукомы, реплантация сетчатки, удаление катаракты, или дренажными процедурами любого вида, рубцевание в роговице и конъюнктиве, фиброз в эндотелии роговицы, фиброз, связанный со щелочным ожогом, фиброз капсулы хрусталика после операции на катаракте, чрезмерное рубцевание в тканях вокруг расположенных вне глаз мышц при хирургическом лечении косоглазия, переднюю подкапсулярную катаракту и заднее подкапсулярное помутнение, переднесеgmentарное фиброзное заболевание глаз, фиброз роговичной стромы (например, связанный с помутнением роговицы), фиброз трабекулярной сетки (например, связанный с глаукомой), заднесеgmentарное фиброзное заболевание глаз, фиброваскулярное рубцевание (например, в сосудистой или хороидальной васкулатуре глаз), фиброз сетчатки, эпиретинальный фиброз, ретинальный глиоз, субретинальный фиброз (например, связанный с возрастной макулярной дегенерацией), фиброз, связанный с постретинальной хирургией и операцией на глаукоме, тракционное отслоение сетчатки в ассоциации с сужением ткани при диабетической ретинопатии, но не ограничиваются ими.

В разных вариантах осуществления изобретения, фибропролиферативное глазное заболевание, состояние или нарушение выбирают из группы, состоящей из пролиферативной витреоретинопатии, фиброза, связанного с окулярной хирургией, фиброза капсулы хрусталика после операции на катаракте, фиброза роговичной стромы и щелочного ожога.

Примеры рака, который можно лечить веществом антитела согласно настоящему изобретению, включают рак легких, рак простаты, рак молочной железы, гепатоцеллюлярный рак, рак пищевода, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак почек, овариальный рак, рак желудка, фиброзный рака, глиому и меланому.

Согласно наблюдениям многие человеческие опухоли (deMartin et al., EMBO J., 6: 3673 (1987), Kuprner et al., Int. J. Cancer, 42: 562 (1988)) и многие опухолевые клеточные линии (Derynck et al., Cancer Res., 47: 707 (1987), Roberts et al., Br. J. Cancer, 57: 594 (1988)) продуцируют TGF β и предлагают возможный механизм таким опухолям избегать нормальный иммунологический контроль.

Экспрессия изоформ TGF β в раковой опухоли является комплексной и изменчивой с разными комбинациями изоформ TGF β , играющими разные роли в отдельных раковых опухолях. Молекулы TGF β могут действовать и как супрессоры опухолей, и как промоторы опухолей. Например, удаление или угнетающая регуляция сигнала TGF β у животных может вызывать повышение развития рака молочной железы, интестинального рака, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки и плоскоклеточного рака, обнаружение присутствия TGF β является важным для предотвращения или замедления прогрессирования опухоли (Yang et al., Trends Immunol 31:220-27, 2010). Впрочем, сверхэкспрессия TGF β , как известно, является проонкогенной, а повышенную экспрессию обнаруживают при многих типах опухолей (Yang et al., supra).

Дополнительные сложности также раскрыты в патенте США 7927593. Например, разные изоформы TGF β , по-видимому, являются более релевантными относительно разных типов рака. TGF β 1 и TGF β 3 могут играть более значительную роль в овариальном раке и его развитии, чем TGF β 2; между тем как экспрессия TGF β 1 и TGF β 2 является более значительной в опухолях хондросаркомы высшей степени, чем TGF β 3. При раке молочной железы человека TGF β 1 и TGF β 3 сильно экспрессируются с появлением экспрессии TGF β 3, чтобы коррелировать с полным выживанием пациентов с узелковым метастазом, а положительная экспрессия TGF β 3 имеет слабые прогностические результаты. Однако, при раке ободочной кишки TGF β 1 и TGF β 2 менее сильно экспрессируются, чем TGF β 3 и присутствуют в более высоких циркуляционных уровнях, чем у безраковых индивидуумов. При глиомах TGF β 2 является важным для клеточной миграции. Из недавних исследований не стало очевидным, какая изоформа TGF β является более полезной для ингибирования при конкретном раке и до какой степени.

Проникновение иммунных клеток в места локализации опухоли, как предполагается, является общим воздействующим фактором на рост опухоли. Эти иммуноклеточные инфильтраты могут благотворно действовать, помогая устранять опухоль, но могут также негативно действовать путем предоставления

толерантности опухолевым антигенам. Показано, что TGF β могут действовать на уровни иммунных клеток в опухолях (смотри, например, Yang et al., Trends Immunol 31:220-27, 2010; Flavell et al., Nature Immunol 10:554-567, 2010; Nagarau et al., Expert Opin Investig Drugs 19:77-91, 2010). Например, TGF β угнетают клетки природных киллеров, которые проникают в опухоли, чтобы удалить опухоль из организма. TGF β также угнетают активность цитотоксических Т-клеток и CD4⁺ хелпера Т-клеток - клеточных типов, которые содействуют в клиренсе опухолей (Yang, выше). TGF β также играют роль в регулировании активности дендритных клеток, например, путем ингибирования миграции в места повреждений и презентации антигена для вызова иммунного ответа. Дендритные клетки реагируют на TGF β и секрет TGF β . Например, дендритные клетки инфильтруют опухоли и захватывают клетки, секрет TGF β и активируют регуляторные Т-клетки, которые в свою очередь могут предотвращать опухолевый клиренс (Flavell et al., supra). Кроме того, супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) представляют собой полученные из костного мозга клетки, которые растут во время прогрессирования опухоли. MDSC ингибируют пролиферацию Т-клеток, угнетают созревание дендритных клеток и ингибируют активность природных клеток-киллеров, тем самым помогая клеткам избегать иммунного ответа (Li et al., J Immunol. 182:240-49, 2009). Продемонстрировано, что TGF β способствуют воздействию MDSC на ингибирование активности природных клеток-киллеров (Li et al., supra; Xiang et al., Int J Cancer 124:2621-33, 2009). Роль различных изоформ TGF β в каждом из этих иммунных процессов не ясна. Селективное нацеливание изоформ TGF β и их ингибирование разной степени может играть важную роль в модулировании иммунного ответа хозяина на противодействие и удаление опухоли.

В определенных вариантах осуществления изобретения, антитело или композиция, описанные в данном документе, модулируют иммунные клетки в опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или фармацевтическая композиция увеличивают количество природных киллерных клеток (NK) в опухоли и/или повышают цитолитическую активность NK-клеток. В разных вариантах осуществления изобретения, антитело или композиция, описанные в данном документе, снижают количество регуляторных Т-клеток в опухоли и/или ингибируют функцию регуляторных Т-клеток. Например, в разных вариантах осуществления изобретения антитело или композиция, описанные в данном документе, ингибируют способность регуляторных Т-клеток подавлять иммунный ответ или мигрировать к месту иммунного ответа.

В разных вариантах осуществления изобретения, антитело или композиция, описанные в данном документе, цитотоксические Т-клетки в опухоли и/или повышают активность CTL, например, стимулируют, повышают или способствуют активности CTL. Например, в разных вариантах осуществления изобретения, антитело или композиция, описанные в данном документе, повышают продуцирование перфорина и гранзима цитотоксическими Т-лимфоцитами и повышают цитолитическую активность CTL.

В разных вариантах осуществления изобретения, антитело или композиция, описанные в данном документе, снижают количество стволовых клеток моноцитарного происхождения (MDSC) в опухоли и/или ингибируют функцию MDSC. Например, в разных вариантах осуществления изобретения, антитело или композиция, описанные в данном документе, ингибируют способность MDSC угнетать иммунный ответ, ингибировать иммунную угнетающую активность MDSC и/или ингибировать способность MDSC содействовать распространению и/или функции регуляторных Т-клеток.

В разных вариантах осуществления изобретения, антитело или композиция, описанные в данном документе, снижают количество дендритных клеток (DC) в опухоли, и/или ингибируют толерогенную функцию (например, толерогенный эффект) дендритных клеток. Например, в разных вариантах осуществления изобретения, антитело или композиция, описанные в данном документе, снижают толерогенный эффект дендритных клеток CD8⁺.

В разных вариантах осуществления изобретения, любое антитело XPA.42.068, XPA.42.089 или XPA.42.681 или их вариант, как описано в данном документе, модулируют одну или более иммунных активностей, описанных выше.

Как указано ранее, экспрессия TGF β вовлечена в начало различных тканевых фиброзов, таких как нефросклероз, фиброз легких и цирроз; а также в начало разных болезненных состояний, таких как хронический гепатит, ревматоидный артрит, сосудистый рестеноз и келоид кожи. В некоторых примерах осуществления изобретения, антитела, описанные в данном документе, используют для лечения фиброза или фибротического состояния. Примеры фиброзов или фибротических заболеваний включают гломерулонефрит, развитой или острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), диабет, диабетическое заболевание почек, фиброз печени, фиброз почек, фиброз легких, постинфарктный кардиальный фиброз, кистозно-фиброзные заболевания, фиброзный рак, постмиокардический, гипертрофию левого желудочка, фиброз легких, цирроз печени, веноокклюзионное заболевание, постспинальное кордовое повреждение, постретинальный фиброз и фиброз после антиглаукомной операции, рестеноз после ангиопластики, почечный интерстициальный фиброз, артериовенозную трансплантационную недостаточность и рубцевание, но не ограничиваются ими.

В одном варианте осуществления изобретения, лечение этих нарушений или состояний у животного, нуждающегося в указанном лечении, включает введение животному эффективного количества анти-

тела или композиции, содержащей антитело, описанное в данном документе.

Состояния, которые лечат способом согласно настоящему описанию, преимущественно встречаются у млекопитающих. Млекопитающие включают, например, людей и других приматов, а также комнатных или домашних животных, таких как собаки и коты, лабораторных животных, таких как крысы, мыши или кролики, и сельскохозяйственных животных, таких как лошади, свиньи, овцы и крупный рогатый скот.

Нетерапевтическое использование.

Антитела согласно настоящему описанию можно использовать в качестве агентов аффинной очистки мишени или в диагностических анализах для белка-мишени, например, выявления его экспрессии в определенных клетках, тканях или сыворотке. Антитела также можно использовать в *in vivo* диагностических анализах. Обычно, для этих целей антитела метят радионуклидами (такими как ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P или ^{35}S) с тем, чтобы антитело можно было локализовать, используя иммуноскинтиграфию.

Антитела согласно настоящему описанию можно использовать в любом известном количественном методе, таком как конкурентно-связывающий анализ, прямой или непрямой сэндвич-анализ, такой как ELISA, и метод иммунной преципитации. Zola, *Monoclonal antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987). Антитела также можно использовать для иммуногистохимии, чтобы метить образцы тканей или клеток, используя известные из уровня техники методы.

Мишенеспецифические антитела можно использовать в стандартном иммуноанализе, включая, без ограничения, ELISA, RIA, FACS, тканевую иммуногистохимию, вестерн-блоттинг или иммунопреципитацию, все из которых являются хорошо известными из уровня техники методами. Антитела согласно описанию изобретения можно использовать для выявления мишени у людей и других млекопитающих. Настоящее описание предлагает способ определения мишени в биологическом образце, включающий контактирование биологического образца с мишенеспецифическим антителом согласно описанию и выявление связанного антитела. В одном варианте осуществления изобретения, мишенеспецифическое антитело непосредственно метят выявляемой меткой. В другом варианте осуществления изобретения, мишенеспецифическое антитело (первое антитело) является немеченым, а второе антитело или другую молекулу, которые могут связывать мишенеспецифическое антитело, метят. Как известно специалистам в данной области техники, второе антитело является выбранным, то есть способным специфически связывать определенные виды и класс первого антитела. Например, если мишенеспецифическое антитело является человеческим IgG, тогда второе антитело будет античеловеческим-IgG. Другие молекулы, которые могут связывать антитело, включают, без ограничения, белок А и белок G, оба имеются в продаже, например, от Pierce Chemical Co.

Предусматривается, что иммуноанализ, раскрытый выше, используется для нескольких целей. Например, мишенеспецифические антитела можно использовать для выявления мишени в клетках или на поверхности клеток в клеточной культуре или секретирующей в культуральную среду тканей. Мишенеспецифические антитела можно использовать для определения количества мишени на поверхности клеток или секретирующей в культуральную среду тканей, которые обрабатывают различными соединениями. Этот метод можно использовать для идентификации соединений, которые полезны для ингибирования или активации намеченной экспрессии или секреции. Согласно этому методу один образец клеток обрабатывают тестируемым соединением в течение периода времени, тогда как другой образец остается необработанным. Если измерению подлежит общий уровень мишени, то клетки разрушают, а общий уровень мишени измеряют, используя один из иммуноанализов, описанных выше. Общий уровень мишени в обработанном образце по сравнению с необработанными клетками определяет эффект тестируемого соединения.

Метки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вещество антитела метят, чтобы облегчить их обнаружение. "Метка" или "обнаруживаемый фрагмент" является композицией, обнаруживаемой с помощью спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических, химических или других физических средств. Например, метки, пригодные для использования в настоящем описании, включают радиоактивные метки (например, ^{32}P), флуорофоры (например, флуоресцеин), электронноплотные реагенты, ферменты (например, как общеиспользуемые в ELISA), биотин, дигоксигенин, а также гаптены и белки, которые можно сделать обнаруживаемыми, например, путем включения радиометки в гаптен или пептид, или использовать для обнаружения антител, специфически реагирующих с гаптеном или пептидом.

Примеры меток, пригодных для использования в настоящем описании, включают флуоресцентные красители (например, флуоресцина изотиоцианат, техасский красный, родамин и подобные), радиоактивные метки (например, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C или ^{32}P), ферменты (например, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и другие общеиспользуемые в ELISA) и колориметрические метки, такие как коллоидное золото, окрашенное стекло или полимерные гранулы (например, полистирол, полипропилен, латекс и так далее), но не ограничиваются ими.

Метку можно присоединять непосредственно или опосредовано к желательному компоненту анализа, согласно известным из уровня техники методам. Предпочтительно, в одном варианте осуществления

изобретения метку ковалентно связывают с биополимером, используя изоцианатный реагент для конъюгирования активного агента согласно описанию. В одном аспекте согласно настоящему описанию, бифункциональные изоцианатные реагенты согласно изобретению можно использовать для конъюгирования метки к биополимеру для образования конъюгата метка-биополимер без активного агента, присоединенного к нему. Конъюгат метка-биополимер можно использовать в качестве промежуточного соединения для синтеза меченого конъюгата согласно описанию или можно использовать для обнаружения биополимерного конъюгата. Как указано выше, можно использовать широкий выбор меток в зависимости от требуемой чувствительности, легкости конъюгирования с желательным компонентом анализа, требованиями стабильности, доступного оборудования и средств утилизации. Нерадиоактивные метки часто присоединяют непрямыми способами. Обычно, лигандную молекулу (например, биотин) ковалентно связывают с молекулой. Лиганд затем связывают с другими молекулами (например, стрептавидином), которые по существу являются обнаруживаемыми или ковалентно связанными с сигнальной системой, такой как обнаруживаемый фермент, флуоресцентное соединение или хемилюминисцентное соединение.

Соединения согласно настоящему описанию можно также конъюгировать непосредственно к сигналгенерирующим соединениям, например, путем конъюгирования с ферментом или флуорофором. Ферменты, пригодные для использования в качестве меток, включают гидролазы, особенно фосфатазы, эстеразы и гликозидазы, или оксидотазы, особенно пероксидазы, но не ограничиваются ими. Флуоресцентные соединения, то есть, флуорофоры, пригодные для использования в качестве меток, включают флуоросцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон и так далее, но не ограничиваются ими. Дополнительные примеры пригодных флуорофоров включают эозин, TRITC-амин, хинин, флуоросцеин W, акридиновый желтый, лиссамиин родамин, В сульфонилхлоридэритросцеин, рутений (трис, бипиридиниум), техасский красный, никотинамидадениндинуклеотид, флавинадениндинуклеотид и так далее, но не ограничиваются ими. Хемилюминисцентные соединения пригодные для использования в качестве меток, включают люциферин и 2,3-дигидрофталазиндионы, например, люминол, но не ограничиваются ими. Для ознакомления с различными системами мечения и сигналпродуцирующими системами, которые можно использовать в способах согласно настоящему описанию, смотри патент США № 4391904.

Специалистам в данной области техники хорошо известны средства обнаружения меток. Так, например, когда метка радиоактивна, то средство обнаружения включает сцинтилляционный счетчик или фотографическую пленку, как в ауторадиографии. Когда метка является флуоресцентной меткой, то ее можно обнаружить, возбуждая флуорохром светом подходящей длины волны и отслеживая вызванную флуоресценцию. Флуоресценцию можно обнаружить визуально, используя электронные детекторы, такие как приборы с зарядовой связью (CCD) или фотоумножители и подобные. Аналогично, ферментные метки можно обнаружить путем обеспечения пригодных субстратов для ферментов и определения конечных продуктов реакции. Колориметрические или хемилюминисцентные метки можно легко обнаружить, наблюдая за цветом, связанным с меткой. Другие системы мечения и обнаружения, пригодные для использования в способах согласно настоящему описанию, будут очевидными для специалиста в данной области. Такие меченые модуляторы и лиганды можно использовать при диагностировании заболеваний или состоянии здоровья.

Составление фармацевтических композиций.

Для введения веществ антител согласно настоящему описанию человеку или подопытному животному предпочтительно составить из них композицию, содержащую один или более фармацевтически приемлемых носителей. Фраза "фармацевтически или фармакологически приемлемый" относится к молекулярным единицам и композициям, которые не производят аллергические или другие вредные реакции, когда вводятся с использованием путей, хорошо известных из уровня техники, как описано ниже. "Фармацевтически приемлемые носители" включают любой и все клинически полезные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные или противогрибковые агенты, изотонические или задерживающие абсорбцию агенты и подобное.

Кроме того, соединения могут образовывать сольваты с водой и обычными органическими растворителями. Такие сольваты также предусмотрены.

Антитела вводят любым пригодным способом, включая парантеральный, подкожный, внутрибрюшинный, внутрилегочный и внутриносовой и, если желательно местное лечение, то внутриочаговое введение. Парантеральные инфузии включают внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутримышечное, внутрикожное или подкожное введение. Кроме того, антитела являются пригодными для введения с помощью пульсовой инфузии, особенно со снижением дозы антитела. Предпочтительно дозировки давать путем инъекций, более предпочтительно внутривенными или подкожными инъекциями, отчасти в зависимости от того, какое введение является быстрым или постоянным. Предусмотрены другие способы введения, включая местное, особенно трансдермальное, чрезкожное, ректальное, оральное или локальное введение, например, через катетер, размещенный близко к желательному месту. Предпочтительными являются инъекции, особенно внутривенные.

Фармацевтические композиции согласно настоящему описанию, содержащие вещество антитела

согласно описанию изобретения в качестве активного ингредиента, могут содержать фармацевтически приемлемые носители или добавки в зависимости от пути введения. Примеры таких носителей и добавок включают воду, фармацевтически приемлемый органический растворитель, коллаген, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, карбоксиполивиниловый полимер, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, полиакрилат натрия, альгинат натрия, водорастворимый декстран, карбоксиметилкрахмал натрия, пектин, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, ксантановую камедь, аравийскую камедь, казеин, желатин, агар, диглицерин, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, вазелин, парафин, стеариловый спирт, стеариновую кислоту, человеческий сывороточный альбумин (HSA), маннитол, сорбитол, лактозу, фармацевтически приемлемое поверхностно-активное вещество и подобное. Используемые добавки выбирают из указанных выше или их композиций, но не ограничиваются ими, сообразно обстоятельствам и в зависимости от лекарственной формы согласно настоящему описанию.

Составление фармацевтической композиции будет меняться в соответствии с выбранным путем введения (например, раствор, эмульсия). Подходящую композицию, содержащую антигено, которое будет вводиться, можно приготовить в физиологически приемлемом наполнителе или носителе. Для растворов или эмульсий подходящие носители включают, например, водные или спиртово-водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и буферную среду. Парентеральные наполнители могут включать раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или нелетучие масла. Внутривенные наполнители могут включать различные добавки, консерванты или компенсаторы жидкости, питательных веществ или электролитов.

Ряд водных носителей, например, стерильные фосфатно-солевые буферные растворы, бактериостатическая вода, вода, забуференная вода, 0,4% солевой раствор, 0,3% глицин и подобное, могут содержать другие белки для повышения стабильности, такие как альбумин, липопротеин, глобулин и так далее, подвергающиеся мягким химическим модификациям, или подобное.

Терапевтические средства антигено готовят для хранения путем смешивания антигена, имеющего желательную степень чистоты, необязательно с физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в виде лиофилизированных лекарственных средств или водных растворов. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиента в используемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфаты, цитраты и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид; гексаметионинхлорид; бензалкония хлорид, фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метилпарабен или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные пептиды (меньше чем приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, Zn-протеиновые комплексы); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Лекарственные средства согласно настоящему документу при необходимости могут также содержать более чем одно активное соединение для конкретного показания, проходящего лечение, предпочтительно агенты с дополнительными активностями, которые не действуют друг на друга отрицательно. Соответственно такие молекулы присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для заданной цели.

Активные ингредиенты также могут заключаться в микрокапсулы, приготовленные, например, с помощью технологии коацервации или полимеризации по границе раздела фаз, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы или поли-(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в микроэмульсиях. Такие технологии описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Лекарственные средства, используемые для *in vivo* введения, должны быть стерильными. Этого легко достичь фильтрованием через стерильные фильтрационные мембраны.

Водные суспензии могут содержать активное соединение в смеси с эксципиентами, пригодными для изготовления водных суспензий. Такие эксципиенты являются суспендирующими агентами, например, карбоксиметилцеллюлозой натрия, метилцеллюлозой, гидроксипропилметилцеллюлозой, альгинатом натрия, поливинилпирролидоном, трагантовой камедью и аравийской камедью; диспергирующими или смачивающими агентами, которые могут быть фосфатидами природного происхождения, например, лецитином, или продуктами конденсации алкиленового оксида с жирными кислотами, например, полиоксиэтиленстеаратом, или продуктами конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами, например, гептадекаэтиленоксиэтанолом, или продуктами конденсации этиленоксида с неполными эфирами, полученными из жирных кислот и гексита, такими как полиоксиэтиленсорби-

толмоноолеат, или продуктами конденсации этиленоксида с неполными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гекситола, например, полиэтиленсорбитанмоноолеат. Водные суспензии могут также содержать один или более консервантов, например, этил или *n*-пропил, *p*-гидроксibenзоат.

Антитела согласно настоящему описанию можно лиофилизировать для хранения и восстановления в подходящем носителе перед использованием. Как было доказано, этот метод эффективен с обычными иммуноглобулинами. Можно использовать любую пригодную технологию лиофилизации и восстановления. Специалистам ясно, что лиофилизация и восстановление могут приводить к разным степеням потери активности антител и что для компенсации используемые уровни можно скорректировать.

Диспергируемые порошки и гранулы, пригодные для приготовления водной суспензии путем добавления воды, обеспечивают активное соединение в смеси с диспергирующим или смачивающим агентом, суспендирующими агентами и одним или более консервантами. Пригодные диспергирующие или смачивающие агенты и суспендирующие агенты представлены агентами, уже указанными выше.

Концентрации антитела в этих лекарственных средствах могут колебаться в широких пределах, например, от меньше чем приблизительно 0,5% в целом или по меньшей мере приблизительно 1% вплоть до 15 или 20% по весу, и подбираться в первую очередь, исходя из объемов жидкости, вязкости и так далее, в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Таким образом, обычная фармацевтическая композиция для парентеральной инъекции может содержать 1 мл стерильной забуференной воды и 50 мг антитела. Обычная композиция для внутривенной инфузии может содержать 250 мл стерильного раствора Рингера и 150 мг антитела. Современные способы приготовления парентерально вводимых композиций для специалиста в данной области техники будут известными или очевидными и подробно описаны в, например, Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980). Эффективная доза антитела находится в диапазоне от 0,01 мг до 1000 мг на кг веса тела на введение.

Фармацевтические композиции могут быть в форме стерильных инъекционных водных, маслянистых суспензий, дисперсий или стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного приема. Суспензию можно составить согласно известному уровню техники, используя те пригодные диспергирующие или смачивающие агенты и суспендирующие агенты, которые были упомянуты выше. Стерильные инъекционные препараты могут также быть стерильными инъекционными растворами или суспензиями в нетоксичном парентерально приемлемом растворителе или растворителе, например, как раствор в 1,3-бутандиоле. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и подобное) и их пригодные смеси, растительные масла, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, старильные нелетучие масла обычно применяют в качестве растворителя или суспензионной среды. Для этой цели можно использовать любое легкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, нашли применение в приготовлении инъекционных препаратов.

Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкостью, чтобы находиться в пространстве инъекционных устройств. Надлежащее жидкое состояние можно поддерживать, например, с помощью использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Она должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения и должна быть защищенной против контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Предотвращение действия микроорганизмов можно осуществить с помощью какого-нибудь из многих антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и подобных. Во многих случаях желательным будет включить изотонические агенты, например, сахара или хлорид натрия. Пролонгированную абсорбцию можно осуществить с помощью использования в композициях какого-нибудь агента, задерживающего абсорбцию, например, моностеарата алюминия или желатина.

Композиции, полезные для введения, можно составлять с агентами, усиливающими поглощение или абсорбцию, для повышения их эффективности. Такие усиливающие агенты включают, например, салицилат, гликохолат/линолеат, гликолят, аprotинин, бацитрацин, SDS, капрат и подобные. См. например, Fix (J. Pharm. Sci., 85:1282-1285 (1996)) и Oliyai and Stella (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:521-544 (1993)).

Композиции антител предусмотрены для использования при ингибировании намеченной активности, включая связывание мишени с ее когнантным рецептором или лигандом, опосредованную мишенью передачу сигнала и подобное. В частности, композиции демонстрируют ингибиторные свойства при концентрациях, которые по существу не вызывают побочные эффекты, и являются поэтому полезными для длительных протоколов лечения. Например, совместным введением композиции антитела с другим менее токсичным агентом можно достичь целебного угнетения состояния или нарушения, проходящих лечение, кроме того, эффективно снижая токсичные побочные эффекты у пациента.

К тому же, свойства гидрофобности и гидрофильности композиций, предусмотренных для использования в настоящем описании, хорошо уравниваются, тем самым повышая их полезность для *in vitro* и особенно *in vivo* использования, тогда как другие композиции, лишённые такого равновесия, яв-

ляются значительно менее полезными. В частности, композиции, предусмотренные для использования в описании изобретения, обладают надлежащей степенью растворимости в водной среде, которая делает возможной абсорбцию и биодоступность в организме, к тому же обладают надлежащей степенью растворимости в липидах, которая позволяет соединениям проходить клеточную мембрану к предполагаемому месту действия. Таким образом, предусмотренные композиции антител являются максимально эффективными, когда их доставляют к месту намеченной антигенной активности.

Введение и дозирование.

В одном аспекте, способы согласно настоящему описанию включают этап введения фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция является стерильной композицией.

Способы согласно настоящему описанию осуществляют с использованием любого с медицинской точки зрения одобренного метода введения терапевтически непосредственно или опосредованно субъекту-млекопитающему, включая инъекции, пероральный прием внутрь, внутриносовое, локальное, трансдермальное, парентеральное введение, ингаляционный спрей, вагинальное или ректальное введение, но не ограничиваясь ими. Термин парентеральный, как использовано в данном документе, включает подкожные, внутривенные, внутримышечные и интрацестеральные инъекции, а также катетерные и инфузионные способы. Введение в специфическое местоположение также предусмотрено путем внутрикожной, интрамаммарной, внутрибрюшинной, внутриоболочечной, ретробульбарной, внутрилегочной инъекции или хирургической имплантации.

В одном варианте осуществления изобретения, введение проводят в местоположение рака, фиброза или пораженных тканей, нуждающихся в лечении, путем непосредственной инъекции в местоположение или с помощью механизма длительной доставки или длительного высвобождения, который может доставлять лекарственное средство внутренне. Например, биodeградирующие микросферы или капсулы, или другие биodeградирующие полимерные конфигурации, способные длительно доставлять композицию (например, растворимый полипептид, антитело или небольшую молекулу), можно включать в лекарственные средства согласно описанию изобретения, имплантированные возле местоположения или в местоположение рака, фиброза или пораженной ткани или органа.

Терапевтические композиции можно также доставлять пациенту в многочисленные местоположения. Многочисленные введения можно подавать одновременно или в течение некоторого времени. В определенных случаях полезным является обеспечение непрерывного потока терапевтической композиции. Дополнительную терапию можно вводить на периодичной основе, например, почасно, суточно, ежедневно, каждые 2 недели, каждые 3 недели, ежемесячно или с более длительным интервалом.

Также в настоящем описании предусмотрено введение сложных агентов, таких как композиция антител в соединении с вторым агентом, как описано в данном документе, включая химиотерапевтический агент или агент, полезный для лечения фиброза, но не ограничиваясь ими.

Количество композиции антител в введенной дозе может изменяться в зависимости от размера индивидуума, которому будут проводить терапию, а также характеристик нарушения, проходящего лечение. В примерах лечения необходимым может быть введение приблизительно 1 мг/день, 5 мг/день, 10 мг/день, 20 мг/день, 50 мг/день, 75 мг/день, 100 мг/день, 150 мг/день, 200 мг/день, 250 мг/день, 500 мг/день или 1000 мг/день. Эти концентрации можно вводить в виде единичной дозированной формы или многократных приемов. Стандартные исследования влияния величины дозы, сначала на животных моделях, а затем в клинических исследованиях, обнаружили оптимальные дозы для конкретных болезненных состояний и популяций пациентов.

Очевидно, что дозирование можно модифицировать, если традиционные терапевтические средства вводить в комбинации с терапевтическими средствами согласно описанию изобретения.

Наборы.

В качестве дополнительного аспекта, описание изобретения включает наборы, которые содержат одно или более соединений или композиций, запакрованных способом, который облегчает их использование в практических способах согласно описанию изобретения. В одном варианте осуществления изобретения такой набор включает соединение или композицию, описанные в данном документе (например, композицию, содержащую мишеньспецифическое антитело само по себе или в комбинации с другим агентом), запакрованные в контейнер, такой как закупоренный сосуд или флакон, с этикеткой, наклеенной на контейнер или включенной в упаковку, которая описывает использование соединения или композиции в способе на практике. Предпочтительно соединение или композицию пакуют в единичную дозированную форму. Набор может дополнительно содержать устройство, пригодное для введения композиции согласно специфическому пути введения или для осуществления скринингового анализа. Предпочтительно набор содержит этикетку, которая описывает использование композиции антител.

Дополнительные аспекты или детали согласно описанию изобретения будут очевидными из следующих примеров, которые предназначены иллюстрировать изобретение, а не ограничивать его.

Примеры

Пример 1. Выделение анти-TGF β антител из библиотек фагового дисплея

Для выделения панели антител, способных нейтрализовать активность TGF β человека, использовали три изоформы белка TGF β , TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3, для пэннинга библиотек фагового дисплея человеческих антител, как описано ниже.

Пэннинг:

Антигены TGF β (PeproTech, Rocky Hill, NJ #100-21, 100-35B, 100-36E) впервые были получены путем биотинилирования с NHS-PEG4-биотином (Pierce, Rockford, IL), используя протокол производителя. Кратко, антигены TGF β , которые хранились в буфере с низким pH, нейтрализовали добавлением 20X PBS до достижения значения pH приблизительно 6,0. Добавляли 30-кратный молярный избыток указанного выше предварительно активизированного биотина и перемешивали, затем выдерживали при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем добавляли равный объем 10 mM глицина, pH 3,0, и образцы тут же помещали на диализ, используя отделяющий диализатор на 6-8 кДа, против 10 mM цитратного буфера, pH 3,5. Библиотеку Fab-фагового дисплея (ХОМА, Berkeley, CA) разделяли с биотинилированным TGF β , используя метод растворимого пэннинга. Каждую изоформу TGF β пэннинговали в отдельности в трех селекционных циклах. Каппа и лямбда суббиблиотеки пэннинговали в отдельности.

Для первого цикла фагового пэннинга 50X эквивалентов библиотеки ($\sim 2 \times 10^{12}$ КОЕ) блокировали на льду в течение 1 часа в 1 мл 5% молоко/PBS. Связующие к стрептавидину отсеивали из заблокированного фага путем добавления заблокированного фага к покрытым стрептавидином парамагнитным микрочастицам DYNABEADS $\text{\textcircled{R}}$ M-280 и инкубирования с вращением в течение 30 минут. Этап отсеивания повторяли еще раз. Для отделения парамагнитных частиц от фага использовали магнит. Одновременно с этапами отсеивания, 200 пмолям биотинилированного TGF β позволяли связываться с покрытыми стрептавидином парамагнитными микрочастицами DYNABEADS $\text{\textcircled{R}}$ M-280 путем инкубирования при комнатной температуре с вращением в течение 30 минут. После связывания частицы биотинилированного TGF β дважды промывали 5% раствором молоко-PBS. Селекцию производили путем добавления отсеянного фага к биотинилированному TGF β связанному с парамагнитными стрептавидиновыми частицами, и инкубирования при вращении в течение от 1,5 до 2 часов. После селекции несвязанный фаг отмывали от парамагнитных частиц, используя магнитно-порошковый процессор Кингфишера (Thermo Scientific), запрограммированный для быстрого трехразового отмывания с PBS-0,1% TWEEN с последующим дополнительным трехразовым отмыванием с PBS. Связанный фаг элюировали из частиц после этапа отмывания путем добавления 100 mM триэтиламина и инкубирования с вращением при комнатной температуре в течение 30 минут. Элюированный фаг нейтрализовали добавлением равного объема 1M Tris-HCl, pH 7,4. Элюированный нейтрализованный фаг затем собирали в пробирку фирмы Falcon объемом 50 мл (Falcon № 352070) и использовали для инфицирования бактериальных клеток TG1 в фазе логарифмического роста ($OD_{600} \sim 0,5$). Инфицирование проводили при 37°C в течение 30 минут без встряхивания с последующим 30-минутным дополнительным инкубированием при 37°C со встряхиванием 90 об/мин. Клетки помещали на агарные чашки для биоанализа со средой 2YT, дополненной 100 мкг/мл карбенициллина и 2% глюкозы (2YTSG), и инкубировали в течение ночи при 30°C, чтобы допустить ночной рост газона.

Для подготовки к использованию в качестве потребляемого продукта для следующего цикла 100X полученного на предыдущем этапе продукта восстанавливали с помощью суперинфекции, используя вспомогательный фаг МК07. Его получали инокулированием среды 2YTSG клетками, соскобленными с полученного в предыдущем пэннинге продукта. OD_{600nm} измеряли для стартовой культуры и восстанавливали до стартового значения $OD_{600nm} \sim 0,05$. Клетки выращивали при 37°C со встряхиванием пока клетки не достигали логарифмической фазы роста $OD_{600nm} \sim 0,5$. Клетки инфицировали МК07 (New England Biolabs, MA) при множественности заражения (MOI) = ~ 20 , при 37°C в течение 30 минут без встряхивания с последующей дополнительной 30-минутной инкубацией при 37°C со встряхиванием 150 об/мин. После инфицирования при 37°C клетки осаждали центрифугированием и переносили на новую среду 2YT, дополненную 50 мкг/мл канамицина и 100 мкг/мл карбенициллина (2YTСК). Культуру выращивали в течение ночи при 25°C. Фаг отделяли от клеток и осаждали центрифугированием, полученный супернатант собирали и использовали в качестве потребляемого продукта в следующем цикле пэннинга. Обогащение с помощью селекции контролировали по количеству потребляемого продукта для каждого цикла пэннинга и полученного титра фага на выходе.

Для второго и третьего циклов пэннинга использовали те же самые жидкофазные протоколы, принятые в первом цикле, но со следующими исключениями. Входное количество фага, используемое в двух циклах пэннинга, составляло $\sim 1,0 \times 10^{11}$ КОЕ. Для второго цикла для селекции использовали 100 пмолей биотинилированного антигена, а для третьего цикла использовали 50 пмолей биотинилированного антигена. После селекции для отмывания несвязанного фага от парамагнитных частиц использовали Кингфишер. Во втором цикле Кингфишер программировали на трехразовое отмывание парамагнитных частиц раствором PBS-0,1% TWEEN в течение 2 минут с последующим отмыванием 1 мл PBS в течение 2 минут, повторяющимся 3 раза. В третьем цикле пэннинга парамагнитные частицы отмывали три раза раствором PBS-0,1% TWEEN в течение 6 минут с последующими двумя четырехминутными отмываниями и

одним шестиминутным отмыванием раствором PBS.

Бактериальные переплазматические экстракты, содержащие секретированные фрагменты антител для использования в скрининге TGF β -связующих получали с помощью стандартных методов. Отдельные колонии отбирали в 96-луночные планшеты, заполненные средой 2YTC, дополненной 100 мкг/мл карбенициллина и 0,1% глюкозы. Культуры выращивали при 37°C со встряхиванием, пока не достигали логарифмической фазы роста ($OD_{600nm} = 0,5$). Колонии затем индуцировали для продуцирования растворимых фрагментов антител добавлением IPTG с конечной концентрацией 1мМ и инкубировали в течение ночи при 25°C со встряхиванием. Переплазматические экстракты (PPE), содержащие растворимые фрагменты антител, получали из индуцированных клеток, используя стандартный метод добавления объемного соотношения 1:3 ледяного раствора PPB (Teknova, Hollister, CA) и бидистиллированной воды (ddH_2O) с комплектом таблеток коктейля свободных от ЭДТА ингибиторов протеаз. PPE затем использовали для скрининга TGF- β связующих.

Скрининг:

Для идентификации клонов, связывающих TGF β включая клоны, которые связывают все три изоформы TGF β и уникальны по своим последовательностям, использовали два альтернативных формата скринингового анализа. Первый скрининговый анализ, использующий иммунный анализ на планшетах и другой скрининговый анализ, проводили с использованием скринингового метода SPR. Иммунный анализ на планшетах включал покрытие непрозрачных белых 384-луночных планшетов EIA 1 мкг/мл клонированного антитела против His (R&D Systems, Minneapolis, MN) при 1 мкг/мл буфера PBS в течение четырех часов при комнатной температуре. Затем планшеты трижды промывали PBS-TWEEN и потом блокировали 0,5% BSA в PBS-TWEEN в течение 1 часа при комнатной температуре. Следующие 30 мкл /лунку биотинилированного TGF β добавляли между 0,1 мкг/мл для TGF β 1 и TGF β 2 и 0,2 мкг/мл для TGF β 3, разведенных в блокирующем буфере. Затем добавляли 30 мкл переплазматического экстракта и инкубировали при 4°C в течение ночи на шадящем планшетном шейкере. Планшеты трижды промывали PBS-TWEEN, затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл /лунку 2,5 мкг/мл стрептавидин-европия (SA-Eu, PerkinElmer), разведенного в буфере для анализа DELFIA (PerkinElmer), и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут на шейкере. Планшеты 7 раз промывали PBS-TWEEN, добавляли по 50 мкл/лунку стимулирующего реагента DELFIA (PerkinElmer) и ставили на шейкер на 8 минут при комнатной температуре, а затем считывали на планшете-ридере Molecular Devices FlexStation 3 в режиме TRF с временем собирания 200-1200 мксек. и Exc.=345 нм, Emm.=618 нм и utoff=590 нм, установка высокого PMT, 20 считываний/лунку. Образцы с сигналом более чем в 2,1 раза выше сигнала негативного PPE-контроля считали положительными.

SPR-анализ проводили с помощью анализа прямого связывания BIACORE A100. В этом анализе чип CM5 BIACORE получали путем стандартного аминного спаривания с использованием набора для аминного спаривания BIACORE (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Антигены TGF β разбавляли до 6 мкг/мл в ацетате, pH 4,0, и инъецировали в течение 7 минут (пятна 1, которые являются TGF β 1) и 10 минут (пятна 2 и 4, которые являются TGF β 2 и TGF β 3). Они иммобилизовались между 3400 и 4800 резонансными единицами (RU) каждого антигена TGF β . Образцы дезактивировали 1М этаноламином. Периплазматические экстракты разбавляли 1:1 с помощью HBS-EP+ (Teknova) с 2 мг/мл BSA и фильтровали через 0,2 мкм фильтр Millex GV (Millipore), а затем инъецировали со скоростью 30 мкл/мин в течение 240 секунд с 30-секундной диссоциацией. Восстановление после каждой PPE-инъекции составляло 10 секунд с 100 мМ HCl. Стабильность точки раннего оповещения в программном обеспечении BIACORE A100 использовали для оценки уровней PPE-связывания. Предельные уровни определяли независимо для каждой изоформы TGF β как таковые, что визуально выше фонового уровня. Предельными резонансными единицами были 245, 175 и 125 для TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3, соответственно.

Созревание аффинности:

Одно антитело, XPA.42.068, которое обладало значительно большей связывающей и нейтрализующей активностью относительно TGF β 1 и TGF β 2 по сравнению с TGF β 3, подвергали "созреванию аффинности" для повышения его аффинности и иммуногенности против TGF β 3. Библиотеку вариантов последовательностей, полученную из "созревания аффинности", разделяли методом пэннинга, используя TGF β 2 и TGF β 3, с выходом клонов, отобранных, в первую очередь, для улучшенного связывания TGF β 3.

Для скрининга, SPR-анализ проводили с помощью анализа прямого связывания BIACORE A100. В этом анализе чип CM5 BIACORE получали путем стандартного аминного спаривания с использованием набора для аминного спаривания BIACORE. Антигены TGF β разбавляли до 1 мкг/мл в ацетате, pH 4,0, и инъецировали в течение 5 минут (пятна 1 и 5, которые являются TGF β 3 и TGF β 1, соответственно) и 8 минут (пятна 2, которые являются TGF β 2). Они иммобилизовались между 200 и 450 резонансными единицами каждого TGF β . Образцы дезактивировали 1М этаноламином. Периплазматические экстракты разбавляли 1:1 с помощью HBS-EP+ с 2 мг/мл BSA и фильтровали через 0,2 мкм фильтр Millex GV (Millipore), а затем инъецировали со скоростью 30 мкл/минуту в течение 240 секунд с 600-секундной диссоциацией. Восстановление после каждой PPE-инъекции составляло 10 секунд с 100 мМ HCl. Базовые вы-

ченные данные наносили на график и проверяли визуально для клонов, которые, казалось, обладали либо большей стабильностью, либо более высокими уровнями связывания. Один производный клон, названный ХРА.42.681, который демонстрировал повышенное связывание с TGF β 3, был включен в дополнительные исследования характерных свойств.

Отобранные клоны преобразовывали в виде IgG2 антител. Вариабельные тяжелые (VH) и легкие (VL) цепи отобранных фрагментов Fab амплифицировали с помощью ПЦА, клонировали в плазмидный вектор, содержащий последовательности константной области антитела, и временно трансфицировали в клетки 293E, используя стандартные способы для получения материала для дополнительного определения характерных свойств, включая исследования, описанные ниже.

Пример 2. Измерение аффинности связывания TGF β -антител

Антитела оценивали относительно TGF β -изоформ TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3 по их аффинности связывания (KD), скорости диссоциации (kd) и скорости ассоциации (ka), используя технологию поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Анализ проводили, используя два метода. Одним методом был метод прямой иммобилизации антигена, в котором белки TGF β иммобилизовали к поверхности при низкой плотности с антителами, инъецированными при серийных концентрациях для кинетического анализа. Другим методом был метод иммобилизованных антител с использованием инъекций разных концентраций инъецированных белков TGF β . Кинетический метод на иммобилизованных антителах: Сенсорный чип А СМ4 (GE Healthcare) использовали в системе BIACORE 2000 (GE Healthcare). Чип предварительно обрабатывали двумя 30-секундными инъекциями по 100 мМ HCl, глицина с pH 2,0, 50 мМ NaOH со скоростью потока 50 мкл/минуту и подвижным буфером перед иммобилизацией. Подвижным буфером для иммобилизации был забуференный HEPES физиологический раствор (HBS-EP+) с 10 мМ HEPES, 150 мМ хлорида натрия, 3 мМ ЭДТА и 0,05% полисорбата 20 (Teknova). Поверхность чипа активировали семиминутной инъекцией свежезамешанного 1:1 раствора 0,1 М N-гидроксисукцинимид (NHS) и 0,4 М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида гидрохлорида (EDC) со скоростью 10 мкл/минуту. После активационной инъекции 1 мкг/мл анти-TGF β антитела в ацетате с pH 4,5 инъецировали со скоростью 10 мкл/минуту в течение одной минуты до намеченной иммобилизации в 12 0 RU. В течение 8 минут инъецировали 1М этаноламингидрохлорид-NaOH с pH 8,5 для блокирования поверхности. Использовали NHS, EDC и этаноламин из набора для аминного спаривания BIACORE.

Кинетический анализ проводили с использованием подвижного буфера в полностью дегазированной форме - буфер HBS-EP+, дополненный 1 мг/мл BSA (Sigma Aldrich, St. Louis MO). Инъекции образцов TGF β проводили со скоростью 50 мкл/минуту в течение четырех минут с 900-секундным временем диссоциации. Каждый белок TGF β (TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3) инъецировали в количестве 10 нМ, 2 нМ, 0,4 нМ, 0,08 нМ (350 нг/мл с 5-кратным серийным разведением) с холостыми пробами, ограничивающими каждую из серийных концентраций и каждую четырехкратную инъекцию. Затем проводили восстановление тремя инъекциями по 30 секунд каждая со 100 мМ HCl в 3М MgCl₂ с последующей финальной 30-секундной инъекцией холостого буфера.

Данные анализировали, используя Scrubber2 (BioLogic Software, Campbell Australia), и ссылались на них дважды путем вычитания данных холостых проточных ячеек и усредненных ограничивающих инъекций. Данные согласовывались путем одновременной аппроксимации KD, скорости диссоциации (kd) и скорости ассоциации (ka) и показаны в табл. 2 ниже. Данные для предварительно измеренного антитела сравнения, названного BM-1 (1D11, R&D Systems MAB1835), также включены в табл. 2. Данные для BM-1 были получены на BIACORE A100. Кратко, антитело BM-1 было захвачено при плотности приблизительно 100 RU на поверхности высокоплотностного кроличьего противомышиного Fc-чипа СМ5 (GE Healthcare). Белки TGF β инъецировали в тех же концентрациях, как описано выше, со скоростью 30 мкл/минуту. На эти данные ссылались дважды и анализировали в программном обеспечении BIACORE A100.

Таблица 2

Данные аффинности из анализа, использующего иммобилизованное антитело и инъецированный TGF β

антитело	TGF β 1			TGF β 2			TGF β 3		
	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD
ХРА.42.068	1,53E+07	9,05E-04	59 пМ	1,04E+07	5,35E-04	51 пМ	8,45E+06	3,84E-03	455 пМ
ХРА.42.089	4,40E+07	1,67E-04	3,8 пМ	1,62E+07	4,14E-04	25 пМ	7,70E+06	1,09 E -02	1,4 нМ
ХРА.42.681	4,25E+07	7,20E-04	1,7 пМ	1,71E+07	4,99E-05	2,9 пМ	1,30E+07	7,50E-05	5,7 пМ
BM-1	1,90E+07	1,40E-03	72 пМ	1,10E+07	2,00E-03	170 пМ	6,50E+06	3,10E-04	48 пМ

Данные аффинности, как измерено в этом анализе с использованием иммобилизованных антител, показали, что ХРА.42.681 обладало более прочным (плотным) связыванием любого антитела для каждой из трех изоформ TGF β , а также связывало каждую из изоформ TGF β со схожей аффинностью. Кроме того, антитела ХРА.42.068 и ХРА.42.089 обладали схожим или более прочным связыванием с изоформами TGF β 1 и TGF β 2 по сравнению с антителом BM-1, но демонстрировали значительно меньшее связывание

вание с изоформой TGFβ3 по сравнению с антителом BM-1 или относительно связывания TGFβ1 и TGFβ2.

Аффинный метод на иммобилизованном TGFβ:

Сенсорный чип CM1 (GE Healthcare), имеющий планарную -COOH поверхность, использовали в системе BIACORE 2000. Чип предварительно обрабатывали двумя 30-секундными инъекциями по 100 мМ HCl, глицина с pH 2,0, 50 мМ NaOH, 1% SDS со скоростью потока 50 мкл/минуту и подвижным буфером перед иммобилизацией. Подвижным буфером для иммобилизации был забуференный HEPES физиологический раствор (HBS-EP+) с 10 мМ HEPES, 150 мМ хлорида натрия, 3 мМ EDTA и 0,05% полисорбата 20. Поверхность чипа активизировали четырехминутной инъекцией свежесмешанного раствора 1:1 0,1М N-гидроксисукцинимид (NHS) и 0,4М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид гидрохлорида (EDC) со скоростью 20 мкл/минуту. После активационной инъекции 0,1 мкг/мл раствора TGFβ в ацетате pH 4,0 инъецировали со скоростью 20 мкл/минуту в течение нескольких минут. Для каждого TGFβ использовали отдельный этап активации на его собственной проточной ячейке, в результате чего TGFβ1 иммобилизовался на Fc2, TGFβ2 на Fc3, а TGFβ3 на Fc4 с Fc1 в качестве активированной и неактивированной холостой пробы.

Инъецированные TGFβ проводили в виде серий от 1 до 2-минутных инъекций, смотря на уровень иммобилизации между каждой инъекцией. Намеченная плотность иммобилизации каждого лиганда TGFβ составляла 30 RU. После иммобилизационных инъекций TGFβ в течение 4 минут инъецировали 1 М этаноламина гидрохлорид-NaOH, pH 8,5, для блокирования поверхности. Использовали NHS, EDC и этаноламин из набора для аминного спаривания BIACORE, а TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3 - от R&D Systems.

Для аффинного анализа подвижный буфер меняли на полностью дегазированную форму - буфер HBS-EP+, сверхдополненный 1 мг/мл BSA (Sigma Aldrich, St. Louis MO). Каждое из антител разводили в подвижном буфере до 5 мкг/мл (33,3 нМ) и 4 последовательные пятикратные разведения готовили, устанавливая концентрации 33,3 нМ, 6, 67 нМ, 1,33 нМ, 267 пМ и 53 пМ для каждого. Их затем инъецировали, используя Kipject, в течение четырех минут со скоростью 50 мкл/минуту с временем диссоциации 900 секунд. Восстановление затем проводили инъекцией 12 мкл (14,4 секунды) 100 мМ HCl со скоростью 50 мкл/минуту с последующей 18-секундной инъекцией буфера. Инъекции охватывали все проточные ячейки одновременно, а образцы проходили инъекцию в четырех повторах с холостыми инъекциями, ограничивающими каждый набор инъекционных групп снижающихся концентраций для каждого антитела. Отсюда следует, что перед тем, как инъецировали тот же образец во второй раз, все другие концентрации всех антител были инъецированы однократно.

Данные анализировали, используя Scrubber2 (BioLogic Software, Campbell Australia), и дважды на них ссылались путем вычитания данных холостых проточных ячеек и усредненных ограничивающих инъекций. Данные согласовывались путем одновременной аппроксимации KD, скорости диссоциации (kd) и скорости ассоциации (ka) и показаны в табл. 3 ниже.

Таблица 3

Данные аффинности из анализа, использующего иммобилизованный TGFβ и инъецированное антитело

антитело	TGFβ1			TGFβ2			TGFβ3		
	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD
ХРА.42.068	5,44E+06	1,70E-03	313 пМ	7,30E+06	7,98E-04	109 пМ	5,45E+06	6,96E-03	1,3 нМ
ХРА.42.089	5,98E+06	1,06E-03	177 пМ	4,80E+06	1,39E-03	290 пМ	8,40E+06	5,70E-02	>17 нМ
ХРА.42.681	1,14E+07	3,63E-04	32 пМ	1,28E+07	3,94E-04	31 пМ	1,23E+07	6,65E-04	54 пМ
BM-1	1,28E+07	3,90E-03	304 пМ	7,00E+06	6,84E-03	977 пМ	5,05E+06	9,46E-04	188 пМ

В соответствии с результатами из табл. 2 для иммобилизованных антител данные аффинности, измеренные в анализе с использованием иммобилизованного антигена (табл. 3) также показывают, что ХРА.42.681 обладало более прочным (плотным) связыванием любого антитела для каждой из трех изоформ TGFβ со схожей аффинностью для каждой из изоформ TGFβ. Кроме того, ХРА.42.068 и ХРА.42.089 обладали схожим или более прочным связыванием с изоформами TGFβ1 и TGFβ2 по сравнению с антителом BM-1, но демонстрировали значительно меньшее связывание с изоформой TGFβ3 по сравнению с антителом BM-1 или относительно связывания TGFβ1. Разница в константах скорости реакций, измеренных с использованием анализа с иммобилизованным антителом в сравнении с анализом с иммобилизованным антигеном, по всей вероятности, возникла в результате сложностей, присущих системе, но, как бы то ни было, каждый обеспечивает относительно высококачественные кинетические данные и стабильность в связывающей способности по всем изоформам TGFβ и среди антител по отношению друг к другу.

Пример 3. Измерение конкурентного связывания с рецептором с помощью TGFβ-антител

Антитела характеризовали по их способности ингибировать или блокировать связывание каждого из трех лигандов TGFβ с рецепторами TGFβ с помощью анализа конкурентного связывания SPR. TGFβ сигнализирует через тип II рецептора TGFβ (TGFβ-RII), который представляет собой серин-треониновый

киназный трансмембранный белок, и нуждается в цитоплазматической ассоциации белка типа 1 рецептора TGF β (TGF β -RI) для активации. Роль TGF β -RI в связывании лигандов неясна, рекомбинантная форма TGF β -RI не демонстрирует какого-либо связывания в тестовых концентрациях с каким-либо из лигандов TGF β 1, TGF β 2 или TGF β 3 или связанными формами TGF β -RII этих лигандов, вследствие чего не могут быть оценены в экспериментах конкурентного связывания с рецептором. Тип III рецептора TGF β (TGF β -RIII) обладает и мембранным связыванием и растворимыми формами и, как полагают, не вовлечен в передачу сигналов TGF β . TGF β -RIIb является сплайс-вариантом, который содержит 26 аминокислотных вставок у N-конца и обладает уникальным свойством связывать все три изоформы TGF β с хорошей аффинностью. TGF β -RII крепко связывает только лиганды TGF β 1 и TGF β 3, при этом TGF β -RIII лучше связывает лиганд TGF β 2.

Сенсорный чип CM5 (GE Healthcare) использовали в системе BIACORE 2000. Чип предварительно обрабатывали несколькими 30-секундными инъекциями по 100 мМ HCl и 50 мМ NaOH со скоростью 50 мкл/минуту перед иммобилизацией. Подвижным буфером для иммобилизации был забуференный HEPES физиологический раствор (HBS-EP+) с 10 мМ HEPES, 150 мМ хлорида натрия, 3 мМ EDTA и 0,05% полисорбата 20. Поверхность чипа активизировали семиминутной инъекцией свежесмешанного раствора 1:1 0,1М N-гидроксисукцинимид (NHS) и 0,4М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (EDC) со скоростью 10 мкл/минуту. После активационной инъекции 5 мкг/мл TGF β -RII, TGF β -RIIb или TGF β -RIII (R&D Systems) в ацетате с pH 4,5 инъецировали со скоростью 20 мкл/минуту в течение четырех минут и достигли иммобилизации, составляющей 1000-4000 RU для каждого рецептора TGF β . Затем в течение 8 минут инъецировали 1 М этаноламина гидрохлорид-NaOH, pH 8,5, для блокирования поверхности. Использовали NHS, EDC и этаноламин из набора для аминного спаривания BIACORE. Fc1 был активированным и деактивированным контролем.

Конкурентные анализы проводили с использованием подвижного буфера в полностью дегазированной форме - буфер HBS-EP+, сверхдополненный 1 мг/мл BSA. Лиганды TGF β использовали во всех инъекциях, кроме холостых контролей, в концентрациях от 100 нг/мл (10 нМ) до 40 нг/мл (4 нМ) и готовили с 10 мкг/мл (66,6 нМ) конкурента и контрольных антител. Образцы уравнивали в течение 40 минут при комнатной температуре перед стартом прогона BIACORE. Уравновешенные образцы затем инъецировали в течение двух минут со скоростью 10 мкл/минуту. Восстановление проводили на каждом цикле одной инъекцией глицина с pH 2,5 со скоростью 50 мкл/минуту в течение 9,6 секунд (8 мкл/сек). Образцы прогоняли по меньшей мере в двух повторах и анализировали уровни связывания TGF β .

Как показано в табл. 4 ниже, результаты для антител XPA.42.068, XPA.42.089, XPA.42.681 и конкурента VM-1 указывают на то, что каждое из этих антител блокирует связывание всех трех лигандов TGF β с рецепторами TGF β -RII и TGF β -RIII и что четкие различия не обнаружены. Этот тип конкурентного рецептора не является универсальным из всех других протестированных антител, для которых не показаны данные в данном описании.

Таблица 4
EC50 (нМ антитела) в анализе конкурентного связывания рецептора

	XPA.42.068	XPA.42.089	XPA.42.681	VM-1
TGF β 1/TGF β -RII	2,0E-09	1,7E-09	2,3E-09	2,4E-09
TGF β 2/TGF β -RII	2,2E-09	1,8E-09	1,7E-09	2,8E-09
TGF β 3/TGF β -RII	1,4E-09	3,4E-08	1,2E-09	1,6E-09
TGF β 1/TGF β -RIII	6,0E-10	1,2E-09	2,2E-09	2,1E-09
TGF β 2/TGF β -RIII	2,4E-09	1,6E-09	2,1E-09	2,5E-09
TGF β 3/TGF β -RIII	1,9E-09	3,1E-08	1,1E-09	1,4E-09

Специфическая активность антител XPA.42.068, XPA.42.089, XPA.42.681 и VM-1 в анализе конкурентного связывания рецептора в основном коррелирует с их аффинностью с разными изоформами TGF β .

Пример 4. Измерение конкурентного связывания эпитопа среди антител к TGF β

Оценивали способность антител XPA.42.068 и XPA.42.089 связывать независимые или перекрывающиеся эпитопы на белках TGF β . Притом, что этот парный анализ не вызывает затруднений в связи с изменяющейся аффинностью антител относительно разных изоформ TGF β , а ковалентная гомодимеризация лигандов TGF β вызывает связывание в двух IgG на гомодимерный индекс (например, самоспаривание), разрабатывается растворимый анализ, основанный на конкуренции.

Сенсорный чип CM5 (GE Healthcare) использовали в системе BIACORE 2000. Чип предварительно обрабатывали четырьмя 30-секундными инъекциями по 100 мМ HCl со скоростью 50 мкл/минуту перед иммобилизацией. Подвижным буфером для иммобилизации был забуференный HEPES физиологический раствор (HBS-EP+) с 10 мМ HEPES, 150 мМ хлорида натрия, 3 мМ EDTA и 0,05% полисорбата 20. Поверхность чипа активизировали семиминутной инъекцией свежесмешанного раствора 1:1 0,1М N-

гидроксисукцинимид (NHS) и 0,4М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (EDC) со скоростью 10 мкл/минуту. После активационной инъекции 1 мкг/мл антитела ХРА.42.089 в ацетате с рН 4,5 инъецировали со скоростью 10 мкл/минуту с течение нескольких минут. Инъекции контролировали и проводили последовательно до достижения уровней иммобилизации, очень близких к 300 RU. В течение восьми минут инъецировали 1 М этаноламина гидрохлорид-NaOH, рН 8,5, для блокирования поверхности. Использовали NHS, EDC и этаноламин из набора для аминного спаривания BIACORE. Fc1 был активированным и деактивированным контролем.

Конкурентный анализ проводили с использованием подвижного буфера в полностью дегазированной форме - буфер HBS-EP+, сверхдополненный 1 мг/мл BSA. TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3 использовали во всех инъекциях в концентрации 0,1 мкг/мл (4 нМ), за исключением холостых контролей, и готовили с 20 мкг/мл (133 пМ) конкурентного и контрольного антител. Рекомбинантный рецептор TGFβ-RIIb-Fc (R&D Systems) также был включен в качестве конкурента. Образцы уравнивали в течение 40 минут при комнатной температуре перед стартом прогона BIACORE. Уравновешенные образцы со скоростью 30 мкл/мин затем инъецировали в течение трех минут во все проточные ячейки. Восстановление проводили на каждом цикле одной инъекцией 50 мМ NaOH со скоростью 50 мкл/минуту в течение 6 секунд (5 мкл/сек) с последующей тридцать второй инъекцией буфера. Образцы прогоняли в двух повторах и анализировали уровни связывания TGFβ в конце трехминутного цикла.

Таблица 5
Конкурентное связывание (иммобилизованное ХРА.42.089)

	TGFβ1	TGFβ2	TGFβ3
холостой	-0,568	0,0655	0,3684
без Ab	63,85	61,05	23,65
ХРА.42.068	10,85	5,18	7,32
ХРА.42.089	1,7	0,3635	9,77
TGFβ-RIIb	-0,316	38,2	-0,378

Как показано в табл. 5 выше, данные указывают на то, что ХРА.42.068 и ХРА.42.089 демонстрировали сильную конкуренцию друг с другом за связывание каждой изоформы TGFβ. Значения репрезентируют средние RU или интенсивность сигнала связывания TGFβ, измеренные во время инъекций конъюгата. Они демонстрируют, что сигнал значительно снижается, когда присутствует конъюгированное антитело. Любая диссоциация конъюгата во время инъекции создавала возможность для связывания свободного или моновалентно связанного TGFβ иммобилизованным антителом ХРА.42.089. Показано, что взаимодействие TGFβ-RIIb с TGFβ2 значительно слабее, чем с белками TGFβ1 и TGFβ3, а быстрая скорость диссоциации создает возможность для относительно слабого конкурирования TGFβ2 против высокоаффинного ХРА.42.089. Антитело ХРА.42.681, производное от ХРА.42.068, не тестировали в конкурентном анализе.

Пример 5. Измерение rhLAP-конкуренции с помощью антител к TGFβ

Предпринимали дополнительные конкурентные анализы для определения того, взаимодействуют ли антитела также с латентной формой TGFβ. Пропротейн TGFβ расщепляли в аппарате Гольджи с помощью фуриноподобной конвертазы до N-концевого 249-аминокислотного пептида, связанного с латентностью, и C-концевого 112-аминокислотного зрелого TGFβ1.

Сенсорный чип CM5 (GE Healthcare) использовали в системе BIACORE 2000. Чип предварительно обрабатывали четырьмя 30-секундными инъекциями по 100 мМ HCl и 50 мМ NaOH со скоростью 50 мкл/минуту перед иммобилизацией. Подвижным буфером для иммобилизации был забуференный HEPES физиологический раствор (HBS-EP+) с 10 мМ HEPES, 150 мМ хлорида натрия, 3 мМ EDTA и 0,05% полисорбата 20. Поверхность чипа активировали семиминутной инъекцией свежесмешанного раствора 1:1 0,1М N-гидроксисукцинимид (NHS) и 0,4М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (EDC) со скоростью 10 мкл/минуту. После активационной инъекции 2 мкг/мл рекомбинантного человеческого связанного с латентностью пептида TGFβ1 (rhLAP) (R&D Systems) в ацетате с рН 4,5 инъецировали со скоростью 10 мкл/минуту в течение четырех минут и получали иммобилизацию rhLAP, составляющую 400 RU. В течение 8 минут инъецировали 1 М этаноламина гидрохлорид-NaOH, рН 8,5, для блокирования поверхности. Fc1 был активированным и деактивированным контролем.

Конкурентный анализ с rhLAP проводили с использованием подвижного буфера в полностью дегазированной форме - буфер HBS-EP+, сверхдополненный 1 мг/мл BSA. TGFβ1 использовали во всех инъекциях, за исключением холостых контролей, в концентрации 0,25 мкг/мл (10 нМ) и готовили с 10 мкг/мл (66,6 нМ) конкурентного и контрольного антител. Образцы уравнивали в течение 40 минут при комнатной температуре перед стартом прогона BIACORE. Уравновешенные образцы затем инъецировали в течение двух минут со скоростью 40 мкл/минуту на поверхность контроля и rhLAP. Восстанов-

ление проводили на каждом цикле двумя инъекциями 100 мМ HCl со скоростью 100 мкл/минуту в течение 9,6 секунд (16 мкл/сек). Образцы прогоняли в двух повторах и анализировали уровни связывания TGFβ1.

В конкурентном анализе с rhLAP тестировали антитела XPA.42.068, XPA.42.089 и компаратор BM-1. Антитело XPA.42.681, производное от XPA.42.068, не тестировали. Как показано на фиг. 1, XPA.42.068, XPA.42.089 и BM-1 продемонстрировали высокий уровень конкуренции с rhLAP, указывающий, что антитела взаимодействуют с активной формой TGFβ и не распознают латентную форму TGFβ.

Пример 6. Измерение нейтрализации антителами TGFβ в анализе HT-2

Чтобы определить, функционально ли нейтрализуют антитела изоформы TGFβ, приспособили методы количественного определения Ruegeger et al. (J Immunol. 144:1767-76; 1990), в результате чего HT-2 мышинные Т-клетки выращивали с IL-4 и с добавлением или без TGFβ1, TGFβ2 или TGFβ3. Изоформы TGFβ ингибировали IL-4-зависимый рост клеток HT-2 благодаря трансактивации генов, стимулирующих угнетение клеточного цикла. IL-4 трансактивирует митогенную программу экспрессии генов путем активации мишеней, таких как c-myc и GM-CSF; при этом передача сигналов TGFβ трансактивирует гены, которые подавляют экспрессию c-myc и GM-CSF. Если передачу сигналов TGFβ устранить нейтрализующим антителом, то клетки HT-2 пролиферируют. Различия в росте оценивали с помощью анализа жизнеспособности клеток CELL TITERGLO® (Promega #G7571), который измеряет АТФ в качестве регистрируемых величин для метаболически активных клеток.

HT-2 мышинные Т-клетки поддерживали с помощью деления каждые 2-3 дня при 1,5e4-2,5e4 клеток/мл в RPMI + 10% FBS, 10 мМ Hepses, 2 мМ глутамин, 50 мкМ 2-ME. Свежий рекомбинантный мышинный IL-2 (R&D Systems) добавляли в концентрации 200 МЕ/мл в каждую колбу из концентрированного исходного раствора. На день 1, клетки промывали в среде для удаления IL-2 и распределяли в непрозрачные 96-луночные планшеты по 10000 клеток на лунку с 2000 МЕ/мл рекомбинантного мышинного IL-4 (R&D Systems). TGFβ1, TGFβ2 или TGFβ3 (PeproTech #100-21, 100-35B, 100-36E) добавляли спустя 1 час после преинкубации с или без антител по всем титрационным сериям. Спустя 48 часов после инкубации при 37°C популяцию жизнеспособных клеток оценивали на MDS Flexstation3, используя CELL TITERGLO® согласно рекомендациям производителя.

Таблица 6
Анализ нейтрализации клеток HT-2

антитело	TGFβ2	TGFβ1	TGFβ3
XPA.42.068	+	98,0	0,0
XPA.42.089	+	57,0	0,0
XPA.42.681	+	высокоактивный	30,3
BM-1	+	220,0	196,0

Первоначально антитела исследовали по поводу нейтрализации активности TGFβ2 при однократном разведении 10 мкг/мл в анализе HT-2, подтверждено, что каждое антитело являлось положительным, антитела XPA.42.068, XPA.42.089 и XPA.42.681 обладали большей специфической активностью, чем антитело сравнения BM-1 при апробированном однократном разведении. Затем определяли нейтрализацию TGFβ1 и TGFβ3 и подсчитывали IC50 для каждого антитела по всем 6-точечным сериям разведения. Кроме того, каждое XPA.42.068, XPA.42.089 и XPA.42.681 демонстрировало более высокую специфическую активность, чем компаратор BM-1, относительно нейтрализации TGFβ1, но только XPA.42.681 демонстрировало более высокую специфическую активность относительно нейтрализации TGFβ3, и, таким образом, было намного специфически активным пан-ингибитором TGFβ (табл. 6). XPA.42.681 демонстрировало повышенную специфическую активность в этом исследовании, при самых низших апробированных концентрациях значительно ингибировало TGFβ1, и, соответственно, специальный расчет IC50 не мог быть произведен.

Пример 7. Измерение нейтрализации с помощью антител к TGFβ в анализе секреции IL-11

Второй анализ нейтрализации оценивает опосредованную TGFβ секрецию IL-11 из клеток A549 карциномы легких, который является частью профибротической реакции в фибробластах легких и эпителиальных клетках. TGFβ также запускает секрецию IL-11 из клеток MDA-MB-231, которые провоцируют метастазирование в кость. Этот анализ моделирует опосредованные TGFβ биологические реакции, которые способствуют фиброзу и метастазирующей опухоли. Анализ секреции IL-11 основывался на Rapoza et al. (J Immunol. Methods 316:18-26; 2006), в соответствии с чем клетки A549 засеивали в 96-луночные планшеты, а на следующий день клетки обрабатывали изоформами TGFβ или без них, предварительно инкубировали в присутствии нейтрализующих антител или без них. Секрецию IL-11 оценивали в супернатантах клеточных культур с помощью ELISA.

В этом анализе клетки A549 выращивали в F12 + 10% сыворотки. За день до анализа клетки раздвинули версеном (для сохранения экспрессии рецепторов) и засеивали по 40000 клеток на лунку в 96-

луночную планшету с плоским дном. На следующий день TGFβ1, TGFβ2 или TGFβ3 предварительно инкубировали при EC80 в течение 1 часа с антителами или без них по всем сериям разведения перед добавлением клеток. В качестве контроля в планшеты добавляли один лишь TGFβ, TGFβ + анти-KLH-G2 контрольное антитело или только одну среду. Спустя 24 часа при 37°C собирали супернатант и оценивали IL-11 с помощью ELISA, используя набор IL-11 Duo Set ELISA (R&D Systems) согласно рекомендациям производителя.

Таблица 7
Анализ секреции IL-11 - IC50 (нг/мл)

антитело	TGFβ1	TGFβ2	TGFβ3
XPA.42.068	220,5	110,5	1795,0
XPA.42.089	37,0	58,0	0,0
XPA.42.681	0,4	1,0	0,8
BM-1	292,0	498,0	12,0

Как показано в табл. 7 выше и подобно HT-2-анализу, результаты анализа секреции IL-11 показали, что XPA.42.681 был наиболее специфически активным, чем любое из антител для каждой из трех изоформ TGFβ. В отличие от HT-2-анализа, антитело XPA.42.681 демонстрировало дозо-зависимый эффект на секрецию IL-11, который давал возможность определить IC50, а также выявить в целом схожие значения IC50 для каждой изоформы TGFβ. Антитела XPA.42.068 и XPA.42.089 также показали хорошую нейтрализацию изоформ TGFβ1 и TGFβ2 (более сильную, чем компаратор BM-1), но значительно меньшую нейтрализацию TGFβ3 по сравнению с антителом BM-1 или относительно нейтрализации TGFβ1 и TGFβ2.

Пример 8. Измерение нейтрализации с помощью антител к TGFβ в анализе pSMAD2

Для дополнительной характеристики антител был разработан анализ фосфо-SMAD2 (pSMAD2), чтобы оценить нейтрализацию передачи сигнала TGFβ через рецепторный комплекс TGFβRII/TGFβRI. Клетки Detroit 562 поддерживали в IMDM + 10% FBS. Клетки разъединяли версеном и помещали в луночную чашку по 500000 клеток на лунку. На следующий день клетки истощали в бессывороточной среде IMDM в течение 3 часов перед 30-минутным воздействием TGFβ1, TGFβ2 или TGFβ3, предварительно инкубированных в течение 1 часа в присутствии антител или без них. Через 30 минут при 37°C клетки лизировали, pSMAD2 и общий SMAD2 оценивали с помощью ELISA, используя коммерческие наборы (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) согласно рекомендациям производителя относительно определения. Процентный состав pSMAD2 приводили к общему SMAD2, а процент ингибирования рассчитывали для каждого клона из нормализованного% pSMAD2 по сравнению с анти-KLH контролем (фиг. 2). Т-исследование (двустороннее) показало, что антитело XPA.42.681 было значительно более активным, чем антитело сравнения BM-1, в нейтрализации передачи сигнала pSMAD во всех изоформах TGFβ (p<0,05). Кроме того, XPA.42.068 было значительно более активным против TGFβ2 по сравнению с компаратором BM-1.

Пример 9. Измерение активности антител к TGFβ в анализе с регуляторными Т-клетками

Для характеристики активности антител на эндогенном TGFβ был разработан анализ с регуляторными Т-клетками Т (Treg), исходя из методов, подобных Tran et al. (Blood 110:2983-2990; 2007). Т-клетки выделяли из замороженных флаконов с человеческими PBMC, используя обогащающий Т-клетки набор EasySep (StemCell Technologies, Vancouver, BC). Т-клетки активировали связанным с планшетом антителом против человеческого CD3 (eBioscience, San Diego, CA) в концентрации 10 мкг/мл и растворимым антителом против человеческого CD28 (eBioscience) в концентрации 2 мкг/мл. Клетки также обрабатывали одновременно 15 мкг/мл антителами против TGFβ и контролем. Спустя 4 дня клетки окрашивали с античеловеческими CD4-FITC (BD Biosciences) и античеловеческими CD25-A647 (BioLegend, San Diego, CA) в течение 30 минут при 4°C. Клетки фиксировали фиксирующим буфером FOXP3 (BioLegend) в течение 20 минут при комнатной температуре и пермеабилizировали в течение 15 минут при комнатной температуре с пермеабилizующим буфером FOXP3 (BioLegend). Клетки окрашивали с 1:25 разведением античеловеческого FOXP3-PE (BioLegend) и анализировали на системе BD FACSCanto™ system. Клетки CD4+ пропускали, а субпопуляции CD4+CD25+Foxp3+ определяли количественно с программным обеспечением FlowJo. Антитела оценивали в этом анализе, используя 4 или 5 разных доноров PBMC, показаны репрезентационные данные 2 доноров (фиг. 3).

Хотя диапазон активности обнаружен вследствие донорозависимых различий в клеточных популяциях, в основном, антитело XPA.42.681 и антитело сравнения BM-1 ингибировали популяцию регуляторных Т-клеток, тогда как антитела XPA.42.068 и XPA.42.089 в этом анализе обеспечивали частичную активность.

Пример 10. Измерение активности антитела TGFβ в анализе EMT

Эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) дает возможность опухолевым клеткам самообновляться, чтобы способствовать раковой инвазии и метастазам. Индукция EMT обусловлена цитокинами,

включая TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3, и все три изоформы могут включаться последовательно в EMT в зависимости от типа тканей (Boyer et al., *Dev. Biol.* 208:530-545, 1999; Bhowmick et al., *Mol. Biol. Cell* 12:27-36, 2001; Camenisch et al., *Dev. Biol.* 248:170-181, 2002). Анализ EMT был разработан с использованием первичных человеческих маммарных эпителиальных клеток (HMEC), подобно Mani et al. (*Cell* 133:704-715; 2008), для определения, ингибируют ли антитела этот процесс *in vitro*.

Человеческие маммарные эпителиальные клетки (Lonza, Basel, Switzerland) выращивали в полной среде MEGM (Lonza), как рекомендовал производитель. Для субкультивирования клетки трипсинизировали и перед посевом обрабатывали раствором, нейтрализующим трипсин (Lonza). Клетки HMEC в количестве 3500 клеток/см² засеивали в 8-луночные слайд-камеры в присутствии 2,5 нг/мл TGF β и без него, преинкубировали в присутствии антител и без них в течение 30 минут. Клетки инкубировали при 37°C в течение 8 дней, а через 4 дня добавляли свежую среду + реагенты. На день 8, клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 15 минут при комнатной температуре. Клетки дважды ополаскивали в PBS и пермеабилizировали в PBS + 0,25% Triton X-100 в течение 10 минут, перед блокированием с PBS-TWEEN + 10% сывороткой козла в течение 30 минут. Клетки окрашивали в течение ночи при 4°C для мезенхимального маркера, используя античеловеческий виментин (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), а для эпителиального маркера использовали античеловеческий E-кадгерин (Cell Signaling Technology), разбавленные 1:200 и 1:500, соответственно. Клетки трижды промывали в PBS и инкубировали с подходящими подсобными антителами - козьим антикроличьим Alexa Fluor 488 или козьим антикроличьим Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Carlsbad, CA), разведенными блокирующим раствором, в течение 1 часа при комнатной температуре и в защищенном от света месте. Слайды промыли и перед флуоресцентной микроскопией заделали с Gold Anti-Fade/DAPI.

Воздействие клеток HMEC на TGF β в присутствии анти-KLN контрольного антитела вызвало увеличение окрашивания виментином и снижение в целом плотности клеток, указывая на опосредованную TGF β задержку пролиферации и дифференцировки до мезенхимального фенотипа. Нейтрализация опосредованного TGF β 1 эпителиально-мезенхиального перехода была очевидной, исходя из сниженного окрашивания виментином, которое коррелирует с клеточной плотностью для антител XPA.42.681, XPA.42.068 и XPA.42.089, тогда как для компаратора VM-1 наблюдался промежуточный ответ, так как окрашивание виментином присутствовало, но не в той степени, как для анти-KLN контроля (данные не показаны). Кроме того, каждое из антител ингибировало EMT под воздействием TGF β 2, хотя антитело сравнения VM-1 проявило меньшую силу, исходя из интенсивности виментинового сигнала, окрашивания E-кадгерином и повышенной плотности клеток. Для нейтрализации опосредованного TGF β 3 эпителиально-мезенхиального перехода антитело XPA.42.681 было наиболее сильнодействующим, за которым следуют VM-1 и XPA.42.068, тогда как XPA.42.089 не отличалось от анти-KLN контроля.

Пример 11. Ингибирование опухолей антителами TGF β в ксенотрансплантатной мышинной модели

Антитела XPA.42.068 и XPA.42.089 оценивали по поводу их способности ингибировать опухолевый рост в ксенотрансплантатной мышинной модели, полученной из клеток Detroit 562 - клеточной линии фарингеального рака человека (Van Aarsen et al., *Cancer Res.* 68:561-70; 2008). Восьми-девятидневным Nu/Nu мышам (Charles River Laboratories) подкожно имплантировали по 5 \times 10⁶ клеток Detroit 562 в BD MATRIGEL™ (1:1, 200 мкл) на животное в нижний левый передний брюшной отдел. Животных распределили по группам случайным образом по двенадцать животных в каждой: анти-KLN человеческий IgG2 изотипный контроль (10 мг/кг), XPA.42.068 (в дозе 1, 3 или 10 мг/кг), XPA.42.089 (в дозе 1, 3 или 10 мг/кг), компаратор VM-1 (3 мг/кг), и мышинный изотипный контроль IgG1 (3 мг/кг). Дозирование и измерения объема опухоли осуществляли дважды в неделю (фиг. 4). Животных умертвляли спустя день после последней дозы (день 28) после лечения 7 дозами антитела. Для всех измерений достоверность различий определяли с помощью одностороннего критерия Стьюдента.

Как показано на фиг. 4, опухоли, обработанные XPA.42.089, изменились меньше, чем опухоли, обработанные XPA.42.068, с достоверной разницей при высших уровнях дозы по сравнению с анти-KLN человеческим IgG2 контролем. Процент ингибирования роста опухоли (TGI) сравнивали с IgG контрольным антителом на 28 день во всех исследуемых группах. Опухоли из групп, обработанных XPA.42.068 (3 и 10 мг/кг), XPA.42.089 (3 и 10 мг/кг), а также компаратором VM-1 (3 мг/кг), были значительно меньше на 28 день, чем опухоли в группах, обработанных 1 мг/кг (значение P <0,05). Кроме того, XPA.42.068 в концентрации 10 мг/кг и XPA.42.089 в концентрации 3 и 10 мг/кг показали достоверные отличия по сравнению с IgG контролем с использованием ANOVA теста Тьюки (табл. 8).

Таблица 8
Ингибирование роста опухоли в ксенотрансплантатной мышинной модели

группы	день 28		
	TGI%	ANOVA множественное сравнение Тьюки значение P<0,05?	односторонний критерий, значение p-
3 мг/кг BM-1 vs мышинного IgG1	70,1	нет	0,0089
1 мг/кг ХРА.42.068	21,3	нет	0,3037
vs анти-KLH IgG2			
3 мг/кг ХРА.42.068 vs анти-KLH IgG2	63,3	нет	0,0339
10 мг/кг ХРА.42.068 vs анти-KLH IgG2	99,8	да	0,0014
1 мг/кг ХРА.42.089 vs анти-KLH IgG2	51,4	нет	0,0948
3 мг/кг ХРА.42.089 vs анти-KLH IgG2	87,3	да	0,0045
10 mg/kg ХРА.42.089 vs анти-KLH IgG2	93,4	да	0,0024

Дополнительную оценку в Detroit 562 ксенотрансплантатной модели проводили, используя антитела ХРА.42.068, ХРА.42.089 и ХРА.42.681. Восемь-девятидневным Nu/Nu мышам (Charles River Laboratories) подкожно имплантировали по 5×10^6 клетки Detroit 562 в BD MATRIGEL™ (1:1, 200 мкл) на животное в нижний левый передний брюшной отдел. Животных распределили по группам случайным образом по двенадцать животных в каждой: анти-KLH человеческий IgG2 изотипный контроль (3 мг/кг), ХРА.42.068 (в дозе 1 или 3 мг/кг), ХРА.42.089 (в дозе 1 или 3 мг/кг), ХРА.42.681 (в дозе 1 или 3 мг/кг), компаратор BM-1 (в дозе 1 или 3 мг/кг). Дозирование и измерения объема опухоли осуществляли дважды в неделю (фиг. 5). Животных умертвляли спустя день после последней дозы (день 30) после лечения 7 дозами антитела. Для всех измерений достоверность различий определяли с помощью одностороннего критерия Стьюдента.

Как показано на фиг. 5 и табл. 9, опухоли, обработанные ХРА.42.681, ХРА.42.089 и компаратором BM-1 в дозе 3 мг/кг, показали достоверные отличия в TGI и среднем объеме опухоли на день 30 по сравнению с контрольным антителом. Сравнение этих групп не показало достоверных различий с использованием ANOVA теста Тьюки.

Таблица 9

Ингибирование роста опухоли в ксенотрансплантатной мышинной модели

группы (vs. анти-KLH IgG2)	день 30		
	TGI%	ANOVA множественное сравнение Тьюки значение P<0,05?	односторонний критерий, значение p
XPA.42.068 (1 мг/кг)	15,9	нет	0,3434
XPA.42.068 (3 мг/кг)	42,7	нет	0,1046
XPA.42.681 (1 мг/кг)	30,4	нет	0,2183
XPA.42.681 (3 мг/кг)	78,7	нет	0,0119
BM-1 (1 мг/кг)	20,7	нет	0,3010
BM-1 (3 мг/кг)	79,3	нет	0,0096
XPA.42.089 (1 мг/кг)	18,5	нет	0,3030
XPA.42.089 (3 мг/кг)	81,8	нет	0,0094

Пример 12. Ингибирование опухолей антителами TGF β в сингенной мышинной модели

Антитела XPA.42.068 и XPA.42.089 также оценивали по поводу их способности ингибировать рост опухоли в сингенной мышинной модели с использованием клеток 4T1 рака молочной железы, используя протокол, основанный на Nam et al. (Cancer Res. 68:3915-23; 2008). Восеминедельным самкам мышей Balb/c подкожно имплантировали по 250000 клеток 4T1 в 4-ую маммарную жировую подушку в день 0. Животных распределили по группам случайным образом по двенадцать животных в каждой и вводили антитело три раза в неделю (начиная с дня -1) при уровне единичной дозы 10 мг/кг с анти-KLH человеческим IgG2 изотипным контролем, XPA.42.068, XPA.42.089, компаратором BM-1 или мышинным изотипным контрольным IgG1. Объемы опухоли измеряли дважды в неделю в течение эксперимента, данные показаны на фиг. 6. Окончательный анализ данных объема опухолей показал, что XPA.42.068 и XPA.42.089 существенно ингибировали рост опухоли по сравнению с контрольным антителом KLH.

Кроме того, животных умертвляли в последний день исследования (день 23), а опухоли извлекали для определения их веса. Каждое из антител XPA.42.089, XPA.42.068 и BM-1 значительно снижало опухолевую массу по сравнению с человеческим и мышинным контрольными антителами (фиг. 7).

Дополнительную оценку в 4T1 сингенной модели проводили, используя антитела XPA.42.068, XPA.42.089 и XPA.42.681. Восеминедельным мышам Balb/c подкожно имплантировали по 250000 клеток 4T1 в 4-ую маммарную жировую подушку в день 0. Животных распределили по группам случайным образом по двенадцать животных в каждой и вводили антитело три раза в неделю (начиная с дня -1) при уровне единичной дозы 10 мг/кг с анти-KLH человеческим IgG2 изотипным контролем, XPA.42.068, XPA.42.089, XPA.42.681, BM-1 или мышинным изотипным контролем IgG1. Объемы опухоли измеряли дважды в неделю в течение эксперимента, данные показаны на фиг. 8. Окончательный анализ данных объема опухолей показал, что каждое антитело XPA.42.068, XPA.42.089, XPA.42.681 и BM-1 существенно ингибировало рост опухоли по сравнению с человеческим и мышинным контрольными антителами.

Кроме того, животных умертвляли в последний день исследования (день 21), а опухоли извлекали для определения их веса. Каждое из антител XPA.42.089, XPA.42.068, XPA.42.681 и BM-1 значительно снижало опухолевую массу по сравнению с человеческим и мышинным контрольными антителами (фиг. 9).

Пример 13. In vivo эффект антител к TGF β на клетки NK в мышинной модели опухоли

Чтобы оценить, демонстрируют ли антитела к TGF β иммунный модуляторный эффект in vivo на природные киллерные клетки (NK), присутствующие в опухоли, выделенные опухоли, которые были извлечены из мышей в 4T1 сингенной модели выше, обработали для получения суспензии отдельных клеток. Кратко, свежесобранные опухоли измельчили и обработали в 2,5 мг/мл коллагеназы II и 2,5 мг/мл коллагеназы IV в HBSS (15 минут при 37°C). Клетки сосчитали и ресуспендировали при 2×10^6 клеток/мл в PBS, 0,5% BSA, 0,1% NaN₃ и 10 мкг/мл 2.4G2 антимишиного Fc-блокирующего антитела (eBioscience, San Diego, CA), инкубировали в течение 15 минут при 4°C. После промывания в PBS с 0,5% BSA клетки окрашивали в течение 30 минут при 4°C с анти-CD335 (анти-NKp46) антителом, конъюгированным для флуоресцентного окрашивания в проточном цитометрическом анализе (BioLegend, San Diego, CA). CD335, также известные как NKp46, являются маркерами клеточной поверхности, исключительно экспрессирующими на CD3-CD56+ NK-клетках, и задуманы как универсальный маркер для клеток NK. Клетки фиксировали в свежеприготовленном 2% параформальдегиде и анализировали на системе BD FACSCanto™. Также готовили одноцветные контроли для компенсации. Как показано на фиг. 10, антитело XPA.42.089 значительно повышало экспрессию NK-клеточного маркера NKp46 (CD335) в опухолях,

извлеченных из мышей, по сравнению с изотипным контрольным антителом. Антитела VM-1, XPA.42.068 и XPA.42.681 не привели к подобному повышению экспрессии NKp46.

Пример 14. *In vivo* эффект антител к TGF β на MDSC в мышинной модели опухоли

Чтобы оценить, демонстрируют ли антитела к TGF β иммунный модуляторный эффект *in vivo* на супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) (CD11b+/Gr1+) присутствующие в опухоли, выделенные опухоли, которые были извлечены из мышей в 4T1 сингенной модели выше, готовили, как описано выше, и окрашивали в течение 30 минут при 4°C с анти-CD11b и анти-Gr1 антителами, конъюгированными для флуоресцентного окрашивания в проточном цитометрическом анализе (BioLegend, San Diego, CA). CD11b, также известные как α_M -интегрин, и миелоидноклеточный дифференцировочный антиген Gr1, также известный как Ly6G, являются маркерами клеточной поверхности, соэкспрессирующими на MDSC. Клетки фиксировали в свежеприготовленном 2% параформальдегиде и анализировали на системе BD FACSCanto™. Также готовили одноцветные контроли для компенсации. Как показано на фиг. 11, антитела XPA.42.068, XPA.42.089 и XPA.42.681 значительно снижали накопление супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC, CD11b+/Gr1+) в опухолях, извлеченных из мышей, по сравнению с изотипным контрольным антителом. Компараторное антитело VM-1 не демонстрировало подобное снижение накопления MDSC.

Пример 15. *In vivo* эффект антител к TGF β на дендритные клетки в мышинной модели опухоли

Чтобы оценить, демонстрируют ли антитела к TGF β иммунный модуляторный эффект *in vivo* на дендритные клетки (DC), присутствующие в опухоли, выделенные опухоли, которые были извлечены из мышей в 4T1 сингенной модели выше, готовили, как описано выше, и окрашивали в течение 30 минут при 4°C с анти-CD11c антителом, конъюгированным для флуоресцентного окрашивания в проточном цитометрическом анализе (BioLegend, San Diego, CA). CD11c, также известные как α_X -интегрин, являются маркером клеточной поверхности, обнаруженным на DC. Клетки фиксировали в свежеприготовленном 2% параформальдегиде и анализировали на системе BD FACSCanto™. Также готовили одноцветные контроли для компенсации. Как показано на фиг. 12, антитело XPA.42.089 значительно снижало экспрессию DC-маркера CD11c в опухолях, извлеченных из мышей, по сравнению с изотипным контрольным антителом. Антитела VM-1, XPA.42.068 и XPA.42.681 не демонстрировали подобного снижения экспрессии CD11c.

Пример 16. *In vivo* эффект антител к TGF β на регуляторные Т-клетки в мышинной модели опухоли

Чтобы оценить, демонстрируют ли антитела к TGF β иммунный модуляторный эффект *in vivo* на регуляторные Т-клетки (Treg), присутствующие в опухоли, выделенные опухоли, которые были извлечены из мышей в 4T1 сингенной модели выше, готовили, как описано выше, и окрашивали в течение 30 минут при 4°C с анти-CD4, анти-CD25 и анти-FOXP3 антителами, конъюгированными для флуоресцентного окрашивания в проточном цитометрическом анализе (BioLegend, San Diego, CA). CD4, также известные как L3T4, как и CD25, также известные как низкоаффинные IL-2R α , и FOXP3, известный как Forkhead-box белок P3, являются маркерами клеточной поверхности, обнаруженным на Treg-клетках. Клетки фиксировали в свежеприготовленном 2% параформальдегиде и анализировали на системе BD FACSCANTO™. Также готовили одноцветные контроли для компенсации. Как показано на фиг. 13, антитело XPA.42.068 значительно снижало накопление Treg-клеток в опухолях, извлеченных из мышей, по сравнению с изотипным контрольным антителом. Антитела VM-1, XPA.42.089 и XPA.42.681 не демонстрировали подобного снижения накопления Treg-клеток.

Пример 17. *In vivo* эффект антител к TGF β на цитотоксические Т-клетки в мышинной модели опухоли

Чтобы оценить, демонстрируют ли антитела к TGF β иммунный модуляторный эффект *in vivo* на цитотоксические Т-клетки (CTL), присутствующие в опухоли, выделенные опухоли, которые были извлечены из мышей в 4T1 сингенной модели выше, готовили, как описано выше, и окрашивали в течение 30 минут при 4°C с анти-CD8 антителом, конъюгированное для флуоресцентного окрашивания в проточном цитометрическом анализе (BioLegend, San Diego, CA). CD8 являются маркерами клеточной поверхности, обнаруженным на CTL. Клетки фиксировали в свежеприготовленном 2% параформальдегиде и анализировали на системе BD FACSCANTO™. Также готовили одноцветные контроли для компенсации. Как показано на фиг. 14, антитело XPA.42.068 значительно повышало уровни CTL в опухолях, извлеченных из мышей, по сравнению с изотипным контрольным антителом. Антитела VM-1, XPA.42.089 и XPA.42.681 не демонстрировали подобного повышения уровней CTL.

Полученные выше результаты демонстрируют, что анти-TGF β антитела, раскрытые в данном документе, обладают способностью снижать размер объема опухоли, а также модулировать иммунные клетки, которые инфильтрируют опухоли и способствуют росту опухоли *in vivo*. Из этого можно сделать вывод, что анти-TGF β антитела, описанные в данном документе, будут обеспечивать терапевтическую пользу при лечении рака, особенно рака, при котором любая одна или более иммунных клеток из приведенных выше примеров проникают в опухолевые клетки.

Пример 18. Улучшение цитолитической активности клеток NK

Сокультивируемую систему клеток природных киллеров (NK) разработали для мимического постоянного взаимодействия между клетками NK и опухолевыми клетками *in vivo* для оценки способности анти-TGF β антител улучшать цитолитическую активность клеток NK. Использовали мышиную клеточную линию 4T1 карциномы молочной железы, продуцирующую TGF β . Клетки NK очищали от селезенки нормальных мышей Balb/c и сокультивировали с CFSE-мечеными опухолевыми клетками 4T1 в течение 48 часов в присутствии IL-2 (500 МЕд/мл) в 6-луночных планшетах. Анти-TGF β и контрольное антитела добавляли в сокультивируемую систему к клеткам NK спустя 48 часов. Продуцирование IFN γ клетками NK измеряли как раз после сокультивирования с помощью внутриклеточного окрашивания. Клетки NK сортировали как CFSE-негативные клетки, а их цитолитическую активность анализировали с помощью стандартных киллинг-анализов против линии Yac-1 опухолевых клеток. Клетки NK сокультивировали с CFSE-мечеными клетками Yac-1 при соотношении эффектор:мишень (E:T), составляющим 20:1, в течение 4 часов в 96-луночном круглодонном планшете. Чтобы засечь гибель клеток использовали окрашивание пропидиум иодидом (PI).

Клетки NK продемонстрировали повышенное, но не значительно увеличенное, продуцирование IFN γ среди обработанных антителами групп по сравнению с группой, обработанной анти-KLH. В киллинг-анализе при соотношении эффектор:мишень, составляющим 20:1, антитело BM-1 и оба антитела XPA.42.089 и XPA.42.681 значительно улучшали цитолитическую активность клеток NK (фиг. 15). Более того, оба антитела XPA.42.089 и XPA.42.681 повышали способность клеток NK убивать клетки-мишени опухоли на 97,8% и 96,7%, уровни которых были значительно больше, чем эталонного компаратора ($P < 0,0001$). Этот результат указывает на то, что нейтрализующие TGF β антитела согласно настоящему описанию могут значительно улучшать цитолитическую активность клеток NK, которая гасилась постоянным взаимодействием опухолевых клеток, продуцирующих TGF β , *in vitro*.

Пример 19. Ингибирование толерогенной функции дендритных клеток CD8+

Исходя из реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR), была разработана *in vitro* система для оценки способности анти-TGF β антител ингибировать толерогенную функцию TGF- β на дендритных клетках CD8+. MLR является классическим экспериментом, используемым для исследования презентации антигена дендритными клетками без добавления внешних антигенов в систему. Селезенки нормальных мышей Balb/c разрезали на небольшие фрагменты и инкубировали в 10% RPMI и 1 мг/мл коллагеназы типа IV в течение 1 часа при 37°C в встряхивающем инкубаторе. После добавления EDTA в течение дополнительных 5 минут раствор фильтровали через нейлоновое сито. Дендритные клетки CD11c+ окрашивали биотинилированным анти-CD11c антителом и позитивно отбирали, используя биотиночищающий набор, производимый Stemcell Technologies. Дендритные клетки CD11c+ окрашивали антителом CD8. Популяции CD8+ и CD8- сортировали на клеточном сортере BD FACSAria™. Дендритные клетки CD8+ культивировали с анти-TGF β антителами или контрольным антителом в течение 24 часов и смешивали с дендритными клетками CD8- при соотношении 1:10. Т-клетки очищали от нормальных селезенок B6, используя набор для отрицательной селекции Т-клеток, производимый Stemcell Technologies, и метили CFSE. Смешанные дендритные клетки затем сокультивировали с B6 Т-клетками в течение 5 дней в 96-луночных круглодонных планшетах. Иммунную ингибиторную функцию дендритных клеток CD8+ оценивали по пролиферации Т-клеток. Если дендритные клетки CD8+ ингибировали способность дендритных клеток CD8- презентовать антигены, то B6 Т-клетки пролиферировали мало. Если анти-TGF β антитела блокировали аутокринное действие TGF β и тормозили толерогенную функцию дендритных клеток CD8+, то B6 Т-клетки пролиферировали больше.

Как показано на фиг. 16, наблюдается небольшое изменение в пролиферации Т-клеток в группе, обработанной BM-1, по сравнению с контрольной группой анти-KLH. В отличие от этого, оба антитела XPA.42.089 и XPA.42.681 значительно повышали пролиферацию Т-клеток по сравнению с группой, обработанной контрольным анти-KLH антителом, а эффект XPA.42.681 на пролиферацию Т-клеток был значительным по сравнению с эталонным BM-1. Эти данные показали, что путем блокирования TGF- β можно снизить толерогенный эффект дендритных клеток CD8+ на иммуногенные дендритные клетки, что может обеспечить повышенную презентацию антигена иммуногенными дендритными клетками.

Пример 20. Повышение функции CTL

Была разработана *in vitro* система для симуляции активации CTL в опухолевых условиях и определения того, будет ли повышаться функция CTL с помощью анти-TGF β антител. Активацию CTL оценивали по экспрессированию и функции CD25 с помощью окрашивания перфорином и гранзимом B (GzmB) (Massague et al. Cancer Cell 8: 369-380, 2005). Т-клетки очищали от нормальных селезенок Balb/c путем негативного отбора Т-клеток (Stemcell Technologies). Гранулы MAC покрывали анти-CD3 и анти-CD28 антителами из набора для активации/распространения Т-клеток, производимого Miltenyi Biotec (Auburn, CA). Т-клетки и покрытые анти-CD3 и анти-CD28 антителами гранулы MAC сокультивировали при соотношении 1:1 и концентрации 2×10^6 клеток/мл в 96-луночном круглодонном планшете в присутствии 20 мкл культурального супернатанта 4T1 в течение 48 часов с анти-TGF β антителами и контрольным антителом. Активацию CTL оценивали по экспрессии CD25 на клеточной поверхности, а функцию оценивали по экспрессии GzmB (фиг. 17A) и перфорина (фиг. 17B), выявленных с помощью внутриклеточ-

точного окрашивания, используя протокол окрашивания FoxP3.

В соответствии с опубликованными данными, изменения экспрессии CD25 не наблюдались среди групп, обработанных антителом, и в контрольной группе. CTL, обработанные VM-1, показали минимальные изменения в экспрессии GzmB и перфорина. Однако, оба антитела XPA.42.089 и XPA.42.681 значительно повышали экспрессию GzmB в CTL по сравнению с контрольной обработкой анти-KLN антителом ($P < 0,001$). Более того, повышение экспрессии GzmB в CTL, обработанных XPA.42.089, было значительно больше, чем обработанных компаратором VM-1 ($P < 0,05$). Что касается перфорина, то CTL, обработанные XPA.42.089 и XPA.42.681, продуцировали значительно меньше перфорина по сравнению с CTL, обработанными контрольным анти-KLN антителом ($P < 0,05$). Кроме того, XPA.42.681 улучшали экспрессию перфорина в CTL существенно больше, чем компаратор VM-1 ($P < 0,05$). Таким образом, оба антитела XPA.42.089 и XPA.42.681 могут восстанавливать экспрессию GzmB и перфорина, угнетенную TGF- β , секретлируемым из опухолевых клеток в этой *in vitro* системе культивирования, и тем самым обеспечивать механизм усиления функции CTL путем нейтрализации TGF β , продуцируемого опухолевыми клетками.

Пример 21. Ингибирование функции MDSC и Treg

Была разработана *in vitro* система сокультивирования для оценки эффекта супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSCs) на распространение и функцию регуляторных T-клеток (Treg), и способности анти-TGF β антител согласно настоящему описанию ингибировать активность MDSC и Treg.

Как известно, MDSC угнетают иммунный ответ против опухоли и стимулируют развитие опухоли и метастазов, а также стимулируют распространение и функцию Treg, которые, как известно, снижают количество иммунных ответов. Самкам мышей BALB/c в абдоминальную молочную железу инокулировали 7×10^3 опухолевых клеток 4T1 в 50 мкл 1X PBS. Селезенки собирали на 21 день, MDSC очищали с помощью меченого биотином антитела CD11b и биотинпозитивного селекционного набора (Stemcell Technologies). Одновременно собирали нормальные селезенки BALB/c, а T-клетки очищали с помощью негативного селекционного набора для T-клеток (Stemcell Technologies). Клетки окрашивали анти-CD4-FITC и анти-CD25-PE антителами. Двойные положительные клетки сортировали с клеточным сортером FAC-SARIA™ (BD Bioscience). Популяцию Treg метили CFSE и сокультивировали с MDSC из опухоли 4T1 инъецированных мышей при соотношении 1:1 в течение 5 в присутствии анти-TGF β или контрольного антител. Распространение Tregs измеряли по делению CFSE. Для оценки действия MDSC на функцию Treg собранные MDSC из 4T1 инъецированных мышей BalB/c метили CFSE и сокультивировали с Treg в течение 5 дней в присутствии анти-TGF β или контрольного антител. Treg сортировали как CFSE-негативную популяцию из сокультуры. T-клетки из нормальных мышей BALB/c метили CFSE и высевали на чашки Петри в концентрации 2×10^6 клеток/мл с гранулами анти-CD3 и анти-CD28. Отсортированные Treg добавляли в культивируемую систему. Ингибиторную функцию Treg измеряли, анализируя количество CFSE-делений T-клеток.

Пример 22. Ингибирование фиброза с помощью антител к TGF β в мышечной модели

Антитела согласно настоящему описанию также оценивали по поводу их способности ингибировать фиброз (например, фиброз легких, фиброз почек) в экспериментальных моделях фиброза на животных.

Фиброз почек.

Модель фиброза почек использовали для оценки анти-TGF β антител (Ling et al., J. Am. Soc. Nephrol. 14:377-388; 2003). Циклоспорин А (CsA, 30 мг/кг) или оливковое масло в качестве контроля растворителем инъецировали подкожно один раз в день в течение 4 недель 6-7-недельным самкам мышей ICR, находящимся на диете с низким содержанием соли (LSD, 50-100 ч./млн. NaCl) для инициирования фибротического заболевания почек. Контрольных животных содержали на нормальной диете и не давали CsA. Анти-TGF β антитело XPA.42.089 или контрольное антитело IgG вводили внутривентриально (2,5 мг/кг, TIW) за день до начала лечения циклоспорином А. Животных умертвляли, сыворотку, мочу и почки собирали для оценки гистологии и ожидаемых результатов функции почек.

Гистопатологическое исследование проводили путем окрашивания фиксированных формалином и залитых парафином срезов почек (5-мкм) гематоксилин-эозином (H&E) и трихромом по Массону, используя стандартные методики. Оценка индуцированных циклоспорином А гистопатологических изменений может включать общепринятый полуколичественный подсчет (Ling et al., Am. J. Physiol. 277:F383-F390, 1999) закодированных срезов и оценку, исходя из любого или всех признаков - канальцевому некрозу, интерстициальных инфильтраций, утолщения артериол, тубулоинтерстициального расширения и фиброза, включая, например, расшифровку с помощью подсчета доли (в процентах) пораженной болезнью зоны на почечный срез. Сагитальные срезы из нормального контроля и мышей, инъецированных CsA и обработанных антителом XPA.42.089, окрашивали трихромом по Массону. Развитие фиброза, индуцированного CsA, наблюдалось в тубулоинтерстициальной ткани мышей, инъецированных CsA, но не у контрольных животных. Кроме того, у мышей, инъецированных CsA, наблюдалось увеличение диаметра просвета некоторых канальцев. Обработка антителом XPA.42.089 снижала количество вызванного CsA фиброза, наблюдаемого в тубулоинтерстициальной ткани, уменьшала диаметр канальцев.

Функцию почек также можно оценивать по любому или всем признакам - сывороточному креатинину, азоту мочевины крови и биомаркерам мочи дисфункции почек.

Азот мочевины крови (BUN) является индикатором почечной дисфункции. В этом исследовании BUN был значительно повышен у мышей, обработанных CsA, по сравнению с контрольными мышами, получающими нормальный корм и диету с низким содержанием соли (фиг. 18). Обработка XPA.42.089 значительно снизила BUN в сыворотке по сравнению с контрольным антителом IgG.

Альбуминурия, или повышение накопления альбумина в моче, является характеристикой клубочковой дисфункции в больной почке. В этом исследовании альбумин мочи был повышен почти в четыре раза в группе CsA-мышей по сравнению с контрольными мышами, получающими нормальный корм и диету с низким содержанием соли (фиг. 19). Обработка XPA.42.089 привела к значительному улучшению альбуминурии по сравнению с мышами, обработанными контрольным антителом IgG.

Уровень коллагена IV типа в моче, который отображает степень депонирования ECM и фиброза в почках, был значительно повышен у CsA-мышей по сравнению с контрольными мышами, получающими нормальный корм и диету с низким содержанием соли (фиг. 20). Обработка XPA.42.089 умеренно снизила уровень коллагена IV типа в моче по сравнению с мышами, обработанными контрольным антителом IgG.

Количественный анализ полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (RT-PCR) проводили на почечных тканях для определения экспрессии генов, вовлеченных в фиброз. Суммарные РНК выделили из почек (кортикальный слой и мозговой слой), используя набор RNeasy (Qiagen, Germantown, MD), согласно протоколу производителя. Первую цепь кДНК синтезировали, используя случайные праймеры и обратную транскриптазу MULTISCRIBE™ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Количественный RT-PCR затем проводили на 2 мкл кДНК, используя SYBR Green mix (Roche) на LIGHTCYCLER 480 - системе ПЦР в реальном времени (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Значения нормализовали до циклофилина и рассчитывали, используя метод сравнительного CT. TGF-β1 является сильным индуктором дифференцировки фибробластов и депонирования белков ECM, включая коллаген III типа. Экспрессия TGF-β1 была почти в четыре раза выше у обработанных CsA мышей по сравнению с контрольными мышами (фиг. 21A). Обработка XPA.42.089 значительно снижала уровни экспрессии TGF-β1 в почке по сравнению с контрольным антителом IgG. Подобный эффект наблюдался для экспрессии коллагена III типа с умеренным повышением, наблюдаемым у обработанных CsA мышей (фиг. 21B). Обработка XPA.42.089 привела к снижению уровней экспрессии коллагена III типа по сравнению с мышами, обработанными контрольным антителом IgG.

Фиброз легких.

Можно использовать модель фиброза легких, в основном как описано Wilson et al. (J. Exp. Med. 207:535-552; 2010). Мышей C57BL/6 анестезировали и внутритрахеально каплями вводили 0,15 Ед сульфата блеомицина (Calbiochem, La Jolla, CA) в физиологическом растворе в присутствии антитела или без него (например, n=10 на группу, 500 мкг) в день -1, 3 и 5. Животных умертвляли на 7 день для анализа легочной гистологии, содержания коллагена в легких (например, депонирования коллагена) и воспалительной инфильтрации. Для легочной гистологии 5-мкм срезы залитой парафином легочной ткани окрашивали трихромом по Массону. Повреждение легких определяли по бронхоальвеолярному лаважу (BAL) коллагена и депонированию коллагена в легких и количественно измеряли, используя Sircol-анализ. Воспалительную инфильтрацию измеряли в BAL с помощью проточной цитометрии.

Пример 23. Лечение офтальмологических нарушений, опосредованных TGFβ

Анти-TGF-β антитела согласно настоящему описанию можно использовать для лечения ряда офтальмологических (т.е., глазных) заболеваний и состояний, включая, например, фиброзные заболевания глаз (например, заболевания, связанные с фибропролиферативными состояниями).

Нейтрализация TGFβ1 в клетках пигментного эпителия сетчатки.

Сохранение эпителиального фенотипа является решающим для тканевого гомеостаза. В сетчатке дедифференцировка пигментного эпителия (RPE) ведет к ретикулярной дисфункции и фиброзу, TGFβ способствует ретикулярной дедифференцировке с помощью ряда механизмов, некоторые из них зависят от активации SMAD2-пути. Антитела согласно настоящему описанию оценивали по поводу их способности противодействовать активации ответов TGFβ в клетках RPE, используя pSMAD2-анализ.

Клетки пигментного эпителия сетчатки (RPE) (Lonza #194987) поддерживали в ростовой среде для клеток пигментного эпителия сетчатки (Lonza#00195409). Клетки отделяли трипсином, трипсин нейтрализовали (нейтрализующий трипсин раствор, Lonza#CC-5002), таблетировали, ресуспендировали до концентрации 10⁶ клеток/мл и помещали по 100000 - 200000 клеток/лунку в 6-луночные чашки. На следующий день клетки промывали и к угнетенным клеткам в фазе G0/G1 добавляли основную среду для RPE (Lonza#00195406). На следующий день клетки обрабатывали 10 нг/мл TGFβ1 (Peprotech #100-21), преинкубировали в течение 5 минут в присутствии анти-TGFβ антител XPA.42.068, XPA.42.089 и XPA.42.681 или без них, эталонных антител BM-1 и BM-2 или контрольного анти-KLH-G2 антитела при концентрации 10 мкг/мл. Спустя 30 минут при 37°C клетки разрушали в свежем клеточном лизисном буфере (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), содержащем 1 mM фенолметилсульфонилфторида

(PMSF). После покачивания в течение 5 минут при 4°C клетки соскребали и перераспределили в 96-глубоколуночный планшет для лизиса на льду в течение 20 минут. Лизаты осаждали при 3К в течение 5 минут при 4°C. Лизаты разбавляли и разгоняли согласно рекомендациям производителя для выявления фосфо-SMAD2 (Cell Signaling #7348) и общего SMAD2 (Cell Signaling #7244).

Как показано на фиг. 22, обработка TGFβ1 вызывает сильное повышение в pSMAD2 в клетках пигментного эпителия сетчатки, которое существенно нейтрализовалось антителами XPA.42.089, XPA.42.068 и XPA.42.681 и эталонными антителами. Эти данные подтверждают, что XPA.42.089, 068 и 681 могут противостоять опосредованной TGFβ передаче сигналов в клетках RPE, и означают, что антитела можно использовать для лечения дисфункций сетчатки.

Пролиферативная витреоретинопатия.

Пролиферативная витреоретинопатия (PVR) является наиболее частой причиной неблагоприятного исхода операции по поводу отслоения сетчатки. PVR характеризуется образованием фиброваскулярных мембран в пределах стекловидной полости над и под сетчаткой, вызывая последующее расслоение сетчатки. Различные факторы способствуют прогрессированию PVR, и TGFβ, как полагают, играет основную роль. TGFβ в избытке встречается в стекловидном теле пациентов с PVR, а характерные функции TGFβ, такие как индуцирование эпителиально-мезенхимального перехода (EMT), стимулирование продуцирования внеклеточного матрикса, сморщивание клеточной мембраны и индуцирование воспаления, являются негативными факторами в прогрессировании PVR.

Для оценки эффекта антител согласно настоящему описанию экспериментальную PVR индуцировали в кроличьей модели (Oshima et al., 2002, Gene Ther. 9:1214-1220; Fastenberg et al., Gene Ther. 2002, 9:1214-1220). Взрослых пигментированных кролей анестезировали внутримышечной инъекцией изофлурана или кетамина и ссилазина. Зрачки расширяли одной каплей 10% фенилэфрина гидрохлорида, 1% тропикамида и 1% атропина сульфата. В один глаз каждого кролика инъецировали по $5,0 \times 10^5$ кроличьих клеток фибробластов конъюнктивы в 0,1 мл раствора BSS в полость стекловидного тела через плоскую часть ресничного тела. Первичная витрэктомия индуцирует модель PVR. После этого тотчас вводили однократную внутривитреальную инъекцию BSS, анти-TGFβ антитела (например, XPA.42.089, XPA.42.681, 5 мг) или контрольного антитела (например, анти-KLH-G2) группам из 10 животных и обязательно повторяли еженедельно. Все инъецированные глаза обследовали офтальмоскопически на 1, 3, 5, 7, 10, 14 и 28 день, с PVR классифицировали на шесть стадий, используя клинический критерий, описанный у Fastenberg et al., Am. J. Ophthalmol. 93:565-572, 1982.

Щелочной ожог до роговицы.

Офтальмологическая травма в форме щелочного ожога до роговицы является серьезной клинической проблемой и может вызывать тяжелое и постоянное нарушение зрения. Активация клеток роговицы, т.е., кератоцитов и эпителиальных клеток, приток воспалительных клеток, таких как моноциты/макрофаги, вовлечены в патогенез травмы после щелочного повреждения тканей в роговице и могут вести к стойким эпителиальным дефектам. Более того, разложение базальной мембраны матриксными металлопротеиназами (MMP, желатиназы), секретируемыми этими клетками, способствует патогенному изъязвлению и перфорации стромы. Конъюнктивализация роговичной поверхности на изъязне лимбальных стволовых клеток вместе с помутнением и неоваскуляризацией стромы роговицы ухудшают зрение пациентов на поздних этапах заживления. Ряд факторов роста и цитокинов, включая TGF-β, как полагают, вовлечены в деструкцию тканей и запоздалое рубцевание, которые возникают в роговице после щелочного ожога.

Для оценки эффекта антител согласно настоящему описанию использовали мышиную модель щелочного ожога (Saika et al., Am. J. Pathol. 2005, 166:1405-18). Кратко, по три мкл 1N раствора гидроксида натрия вводили в правый глаз взрослых мышей C57BL/6 (n=72) под общей и местной анестезией для получения щелочного ожога поверхности глаз. Анти-TGF-β антитела (например, XPA.42.089, XPA.42.681) или контрольное антитело (например, анти-KLH-G2) вводили (n=24/группа) спустя два часа и на 5, 10 и 15 день после введения щелочи. Для визуализации поверхностных дефектов (например, поврежденного эпителия) использовали окрашивание роговицы флюоресцеином. После обследования роговицы с флюоресцеином глазное яблоко вылущивали спустя 2 часа после мечения бромдезоксисуридином и обрабатывали для гистологического исследования или в парафине, или делая криосрезы на 3, 5, 10 и 20 день.

Фиброз хрусталика.

Следующее повреждение, эпителиальные клетки хрусталика подвергались эпителиально-мезенхимальному переходу (EMT), который способствует образованию фиброзной ткани в поврежденном хрусталике. Подобный феномен наблюдается в капсуле хрусталика человека после удаления катаракты и имплантирования искусственного хрусталика. Такая EMT-связанная фиброзная реакция является клинически не желательной, поскольку она может вызвать помутнение и сжатие остальной передней капсулы хрусталика, так же как и помутнение в задней капсуле. Внутриглазная жидкость содержит избыточный TGF-β, что наводит на мысль о роли TGF-β в повреждении, связанном с EMT в эпителиальных клетках хрусталика.

Для оценки эффекта антител согласно настоящему описанию экспериментальный фиброз роговицы

индуцировали в мышинной модели (Saika, et al., Am J Pathol. 2004, 164:651-663). Взрослых мышей (возраст 4-6 недель) анестезировали внутрибрюшинной инъекцией пентобарбитала натрия (70 мг/кг). Делали небольшие надрезы в центральной передней капсуле лезвием гиподермальной иглы 26 калибра через роговичные надрезы в правом глазу после местного введения мидриатического средства и оксипрокаиновых глазных капель в качестве анестетика. Сразу же после этого в глаза вводили анти-TGF β антитела (например, ХРА.42.089, ХРА.42.681) или контрольное антитело (например, анти-KLH-G2) (n=24/группа) дважды в неделю для продолжения исследования. Левый глаз служил в качестве неповрежденного контроля. Глубина повреждения составляет ~300 мкм, или приблизительно одну четвертую длины лезвия иглы, что ведет к образованию фиброзной ткани вокруг капсулярной трещины. После нанесения офлоксациновой мази животным позволяли подлечиваться в течение от 6 часов до 8 недель. Пролиферирующие клетки метили внутрибрюшинной инъекцией бромдезоксипуридина, спустя 2 часа животных умертвляли, а каждый глаз вылушывали для анализа.

Постоперационная антиглаукомная операция.

Основным решающим фактором отдаленного результата антиглаукомной операции является ранозаживляющая реакция. Чрезмерное постоперационное рубцевание на уровне конъюнктивы и склеростомия связаны со слабым постоперационным контролем давления. Использование антипролиферативных агентов 5-фторурацила (5-FU) и митоцина С (ММС) в такой хирургии может также вызывать масштабную гибель клеток и апоптоз и может проявиться изъязвлением роговицы и кистозными бессосудистыми пузырьками.

Для оценки эффекта антител согласно настоящему описанию на эти состояния, связанные с антиглаукомной операцией, использовали кроличью модель (Mead et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003, 44:3394-3401). Антиглаукомную фильтрующую операцию проводили на левых глазах Новозеландской породы кроликов-альбиносов (в возрасте 12 и 14 недель) под общим наркозом (кетамин и ксилазин). Шелковый роговичный шов-держалку с частичной толщиной 8-0 накладывали на 12 часов, чтобы добиться выделения расположенной выше конъюнктивы.

Конъюнктивальный лоскут, вырезанный основанием к своду, подняли, а тупое отделение субконъюнктивального пространства проводили на расстоянии 15 мм за лимбом. Скальпель MVR использовали для формирования склерального туннеля частичной толщины, заводя 4 мм за лимб и продолжая, пока скальпель виден только в передней строме роговицы. Внутривенную канюлю 22-калибра/25-мм затем проводили через склеральный туннель, пока игла канюли видима в прозрачной роговице. Игла канюли входит в верхнюю камеру, канюля двигается к центральной зрачковой зоне, а игла вынимается. Наконец, канюлю подрезали и скосили возле ее склерального конца, с тем, чтобы она выступала на 1 мм от точки ввода, а 10-0 нейлоновый шов использовали для фиксации трубки к склеральной поверхности. Конъюнктивальный разрез закрывали двумя узловыми швами, а центральный матрасный 10-0 нейлоновый шов на игле дает водонепроницаемое закрытие. Одну каплю мази сульфата атропина 1%, фосфата натрия бетаметазона 0,1%, неомицина сульфата 0,5% наносили в конце операции. Животных затем случайным образом распределяли для получения послеоперационного курса субконъюнктивальных инъекций (100 мкл) пнти-TGF β антитела (например, ХРА.42.089, ХРА.42.681) или контрольного (например, анти-KLH-G2) (например, 5 мг/мл; 16/группа). Субконъюнктивальные инъекции проводили на 2, 3, 4, 7, 9, 11 и 14 день после операции (день 0) под местной анестезией (проксиметакаина гидрохлорида 0,5% глазные капли, 1 капля на глаз), используя иглу 30 калибра. Антитела инъецировали 5 мм за лимбом у носового края верхней прямой мышцы. 5-FU вводили в 180° от места операции.

Измерение внутриглазного давления в обоих глазах осуществляли с помощью ручного тонометра после местного нанесения глазных капель 0,5% проксиметакаина HCl. Следили за внешним видом конъюнктивы и дренажной зоны. Всех животных изучали с помощью замаскированного наблюдателя в назначенное время после операции. Оценку обоих глаз (противоположный необработанный глаз служил в качестве контроля) делали ежедневно с дня 0 по день 4 и с этого времени периодически, по меньшей мере, дважды в неделю. Характеристики пузырьков, включая длину, ширину и высоту, измеряли циркулями, записывали внутриглазное давление. Васкулярные характеристики дренажных пузырьков градируют путем распределения конъюнктивальных зон по квадрантам и отмечая признаки (0, бессосудистый; +1, нормальная васкуляризация; +2, гипермированная; и +3, очень гипермированная). Осмотр глаза с помощью щелевой лампы проводили для идентификации активности передней камеры (0, спокойно; 1, клетки; 2, фибрин; и 3, гипопион) и глубины передней камеры, которую записывали как глубокая (+2), неглубокая (+1), или плоская (0). Оценку длительности роговичной эпителиопатии проводили после нанесения лидокаина флюороэсцена в левый глаз и градируют согласно площади повреждения роговицы (0, нуль; 1, <5%; 2, <50%; 3, <75%; 4, <90%; 5, вплоть до 100%). Продолжительность существования пузырьков брали в качестве основного критерия оценки эффективности. Недостаточность пузырьков определяли по таким признакам, как плоский, васкуляризованный и покрытый рубцами пузырек при наличии глубокой передней камеры. Анализировали площадь и высоту пузырьков, глубину и активность передней камеры, конъюнктивальную васкуляризацию на квадрант. От некоторых животных брали ткани для гистологических исследований (например, субконъюнктивального отложения коллагена).

Предполагается, что анти-TGFβ антитела, раскрытые в данном документе, ингибируют активность TGFβ во время инцидентов фиброза в глазе, тем самым снижая фиброзные отложения и улучшая симптомы, связанные с фиброзом глаз.

Ожидается, что многочисленные модификации и вариации в описании, как указано выше в иллюстративных примерах, будут очевидными для специалиста в данной области. Следовательно, только те ограничения, которые фигурируют в прилагаемой формуле изобретения, должны заноситься в описание.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение антитела, которое связывается с трансформирующим фактором роста бета (TGFβ)1, TGFβ2 и TGFβ3, где антитело содержит:

- (a) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:19;
- (b) CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:20;
- (c) CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:21;
- (d) CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:22;
- (e) CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:23; и
- (f) CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:24;

для получения лекарственного средства для лечения колоректального рака, гепатоцеллюлярной карциномы, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака почки, рака легких, фиброзного рака или фибропролиферативных заболеваний,

где лекарственное средство можно вводить вместе с одним или несколькими вторыми лекарственными средствами.

2. Применение антитела, которое связывается с трансформирующим фактором роста бета (TGFβ)1, TGFβ2 и TGFβ3, где антитело содержит:

- (a) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:19;
- (b) CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:20;
- (c) CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:21;
- (d) CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:22;
- (e) CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:23; и
- (f) CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:24;

для получения лекарственного средства для лечения колоректального рака, гепатоцеллюлярной карциномы, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака почки, рака легких, фиброзного рака или фибропролиферативных заболеваний,

где антитело можно вводить в дозе примерно 1 мг/кг, примерно 3 мг/кг или примерно 10 мг/кг, или где антитело можно вводить в дозе примерно 1000 мг.

3. Применение антитела, которое связывается с трансформирующим фактором роста бета (TGFβ)1, TGFβ2 и TGFβ3, где антитело содержит:

- (a) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:19;
- (b) CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:20;
- (c) CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:21;
- (d) CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:22;
- (e) CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:23; и
- (f) CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:24;

для получения лекарственного средства для лечения колоректального рака, гепатоцеллюлярной карциномы, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака почки, рака легких, фиброзного рака или фибропролиферативных заболеваний,

где антитело можно вводить еженедельно, каждые 2 недели, каждые 3 недели или ежемесячно.

4. Применение антитела, которое связывается с трансформирующим фактором роста бета (TGFβ)1, TGFβ2 и TGFβ3, где антитело содержит:

- (a) CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:19;
- (b) CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:20;
- (c) CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:21;
- (d) CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:22;
- (e) CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:23; и
- (f) CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:24;

для получения лекарственного средства для лечения колоректального рака, гепатоцеллюлярной карциномы, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака почки, рака легких, фиброзного рака или фибропролиферативных заболеваний,

где антитело можно вводить внутривенно или подкожно.

5. Применение по любому из пп.1-4, где антитело содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична вариабельному участку тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на

90% идентична вариабельному участку легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:8.

6. Применение по любому из пп.1-5, где антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6 и вариабельный участок легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:8.

7. Применение по любому из пп.1-6, также содержащее константную область тяжелой цепи, где константная область тяжелой цепи представляет собой модифицированный или немодифицированный IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, их фрагмент или их комбинации.

8. Применение по любому из пп.1-7, также содержащее константную область легкой цепи, где константная область легкой цепи представляет собой модифицированную или немодифицированную константную область лямбда-легкой цепи, константную область каппа-легкой цепи, их фрагмент или их комбинации.

9. Применение по любому из пп.1-8, где одна или несколько аминокислот каркаса легкой цепи антитела заменены соответствующей аминокислотой(ами) аминокислотной последовательности другого антитела человека.

10. Применение по любому из пп.1-9, где антитело также содержит константную область легкой цепи человека, присоединенную к вариабельному участку легкой цепи.

11. Применение по любому из пп.1-10, где антитело находится в стерильной фармацевтической композиции, содержащей антитело и фармацевтически приемлемый носитель.

12. Применение по любому из пп.2-4, также содержащее одно или несколько вторых лекарственных средств.

13. Применение по п.1 или 12, где второе лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из химиотерапевтического средства, цитотоксического средства и азациитидина.

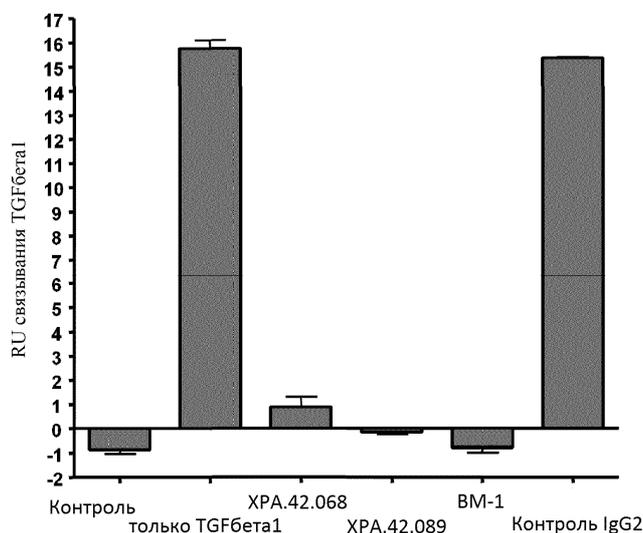
14. Применение по любому из пп.1-13, где антитело находится в лиофилизированной форме или жидкой форме.

15. Применение по пп.1 и 3-4, где антитело можно вводить в дозе примерно 1 мг/кг, примерно 3 мг/кг или примерно 10 мг/кг, или его можно вводить в дозе примерно 1000 мг.

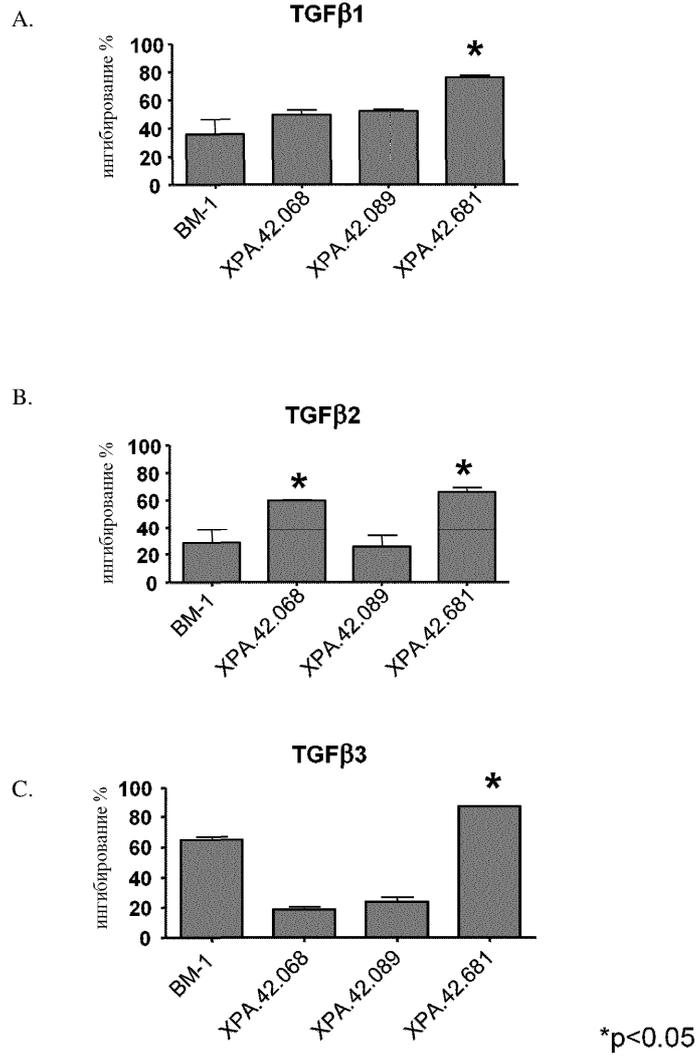
16. Применение по любому из пп.1, 2 или 4, где антитело можно вводить еженедельно, каждые 2 недели, каждые 3 недели или ежемесячно.

17. Применение по любому из пп.1-3, где антитело можно вводить внутривенно или подкожно.

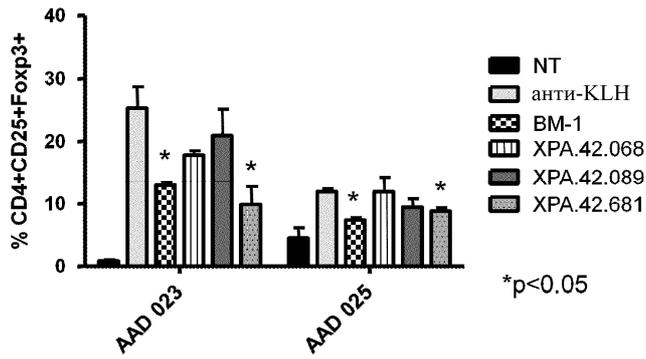
18. Применение по п.1 или 12, где одно или более вторых лекарственных средств можно вводить либо одновременно, либо последовательно.



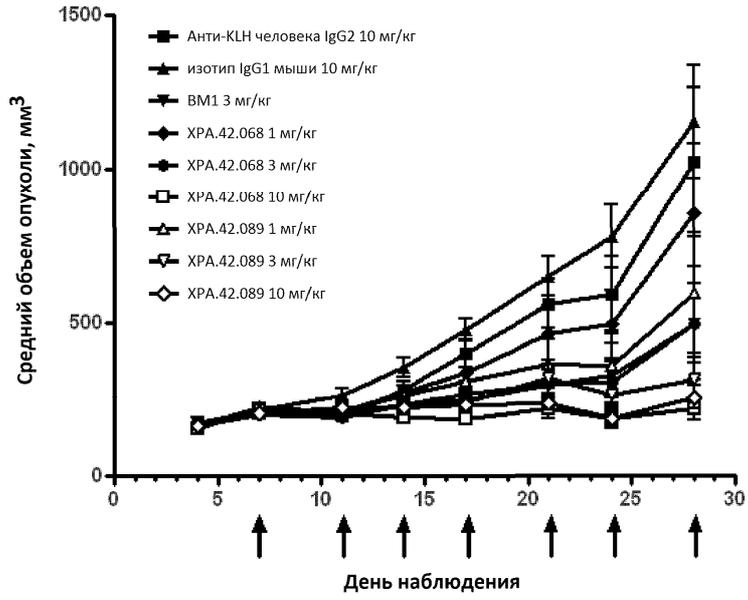
Фиг. 1



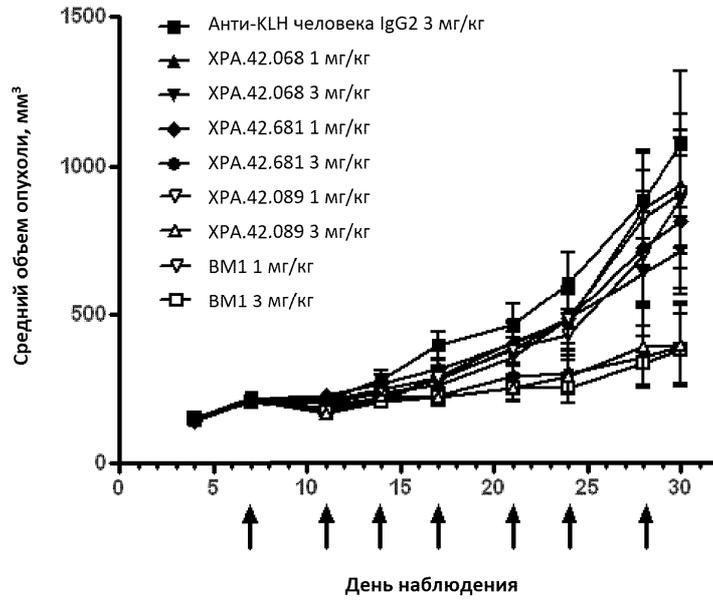
Фиг. 2



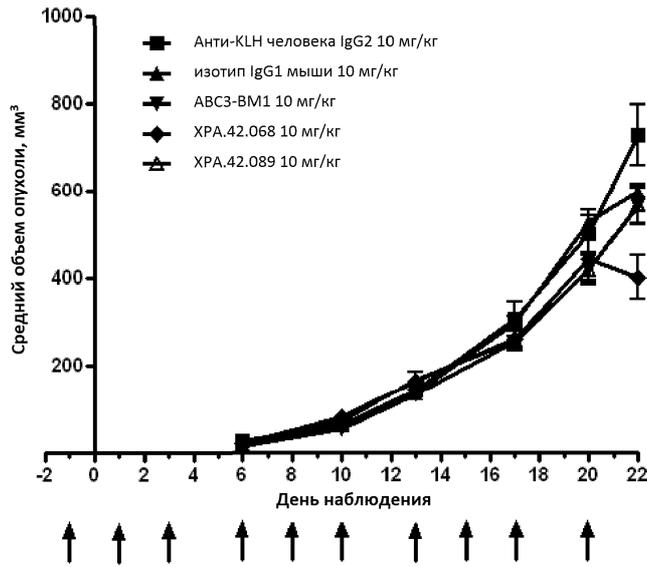
Фиг. 3



Фиг. 4



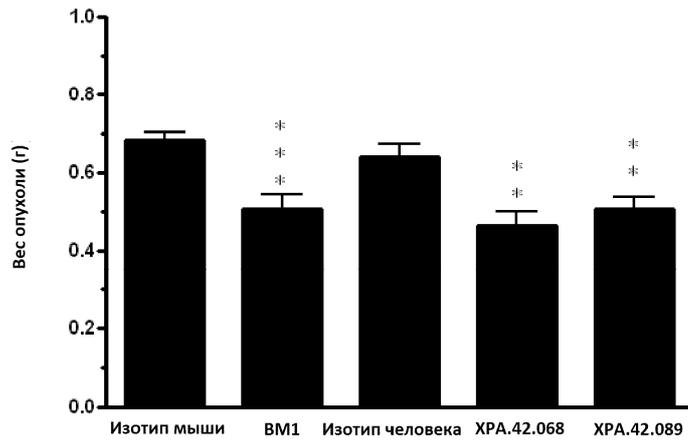
Фиг. 5



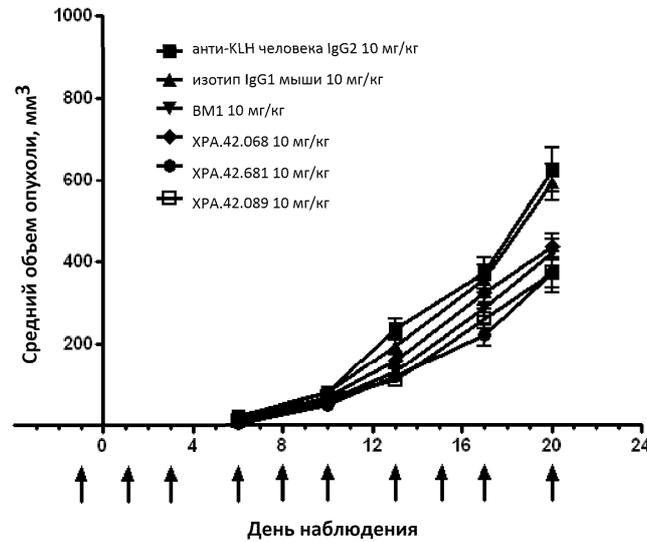
Фиг. 6

** p < 0,01 по сравнению с изотипом человека (односторонний критерий Стьюдента)

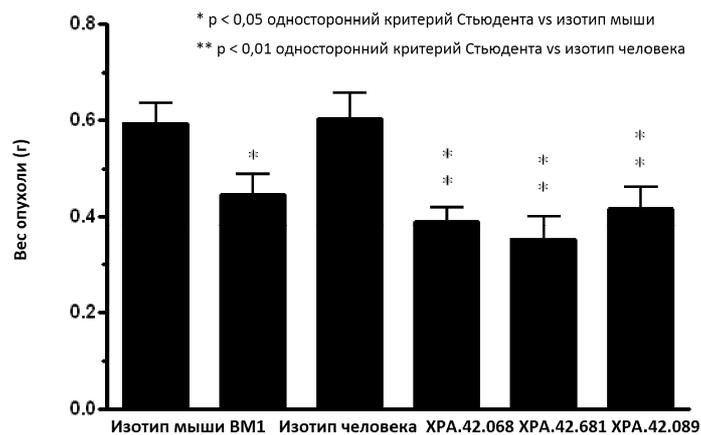
*** p < 0,001 по сравнению с изотипом мыши (односторонний критерий Стьюдента)



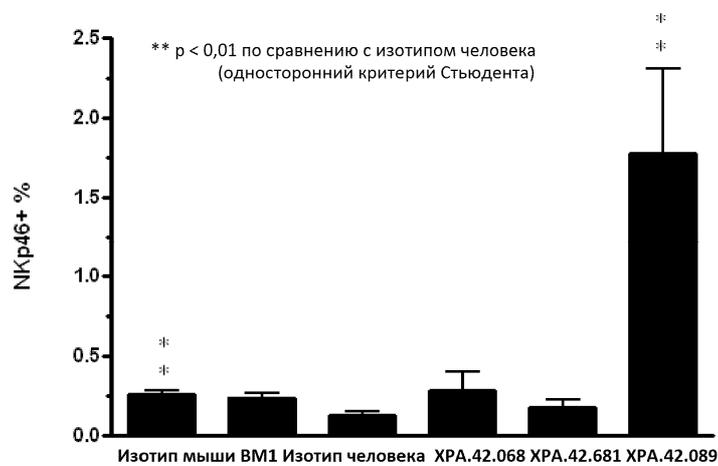
Фиг. 7



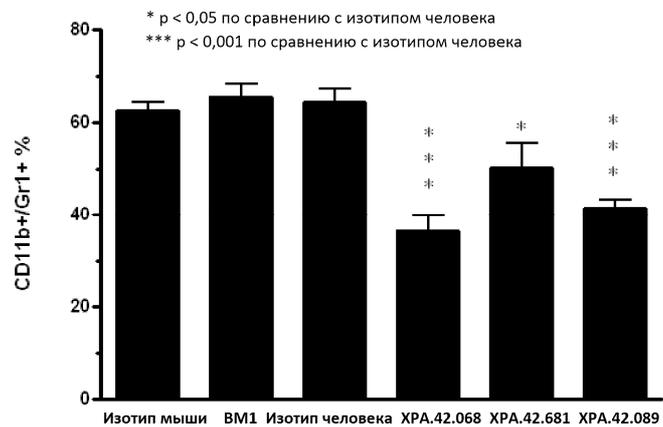
Фиг. 8



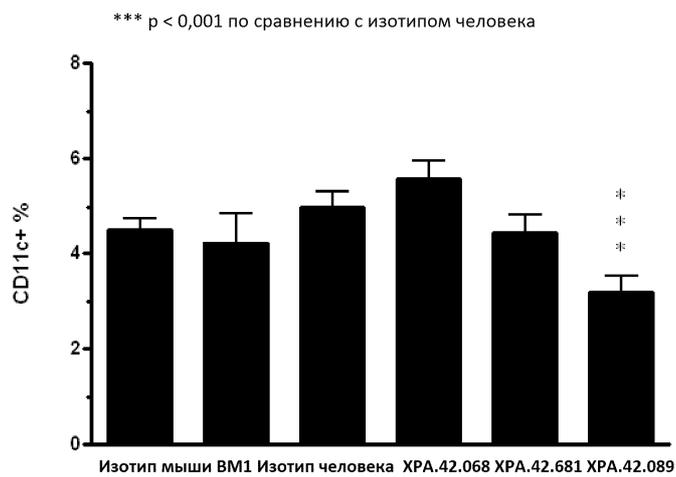
Фиг. 9



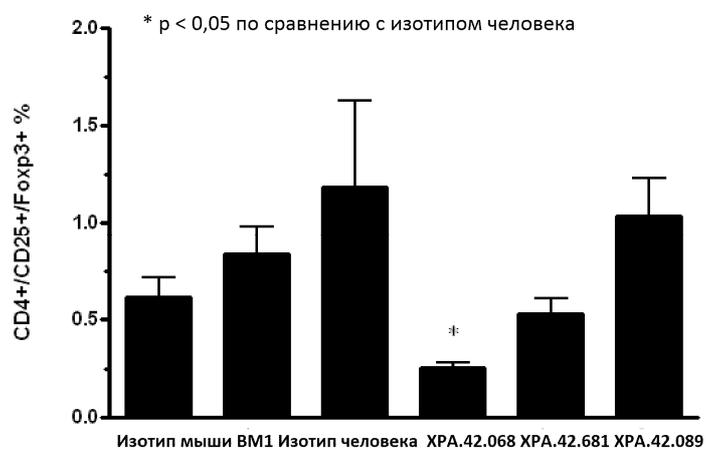
Фиг. 10



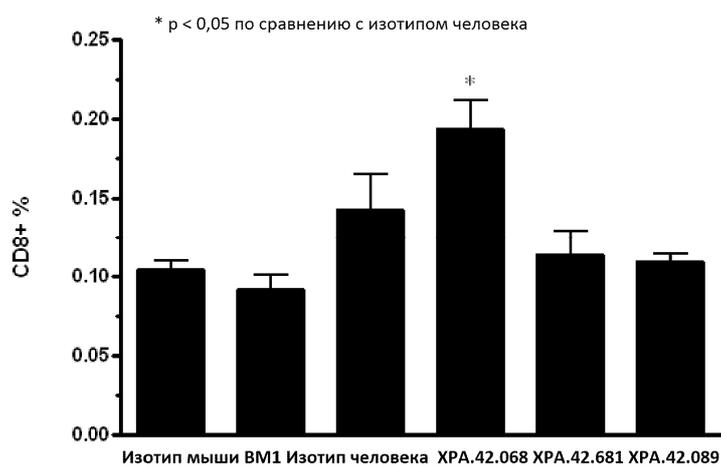
Фиг. 11



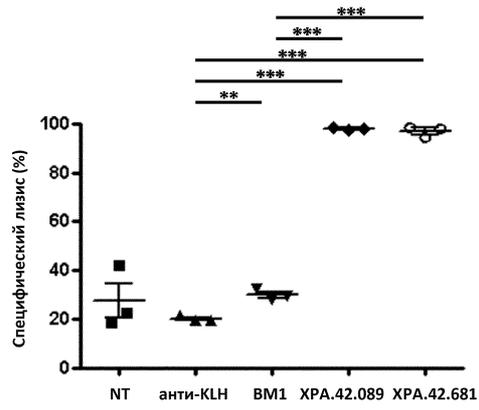
Фиг. 12



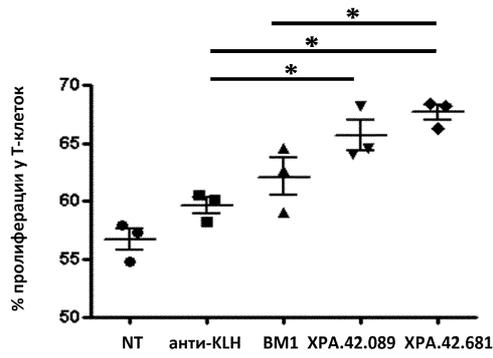
Фиг. 13



Фиг. 14

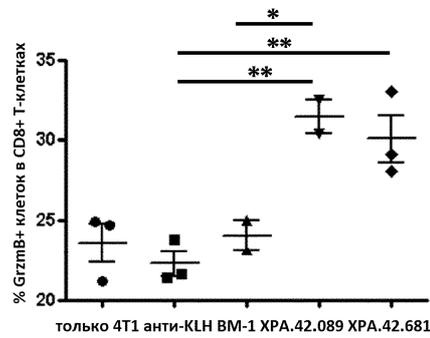


Фиг. 15

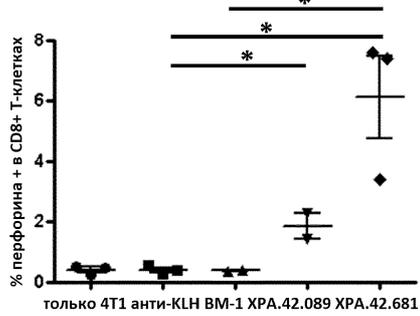


Фиг. 16

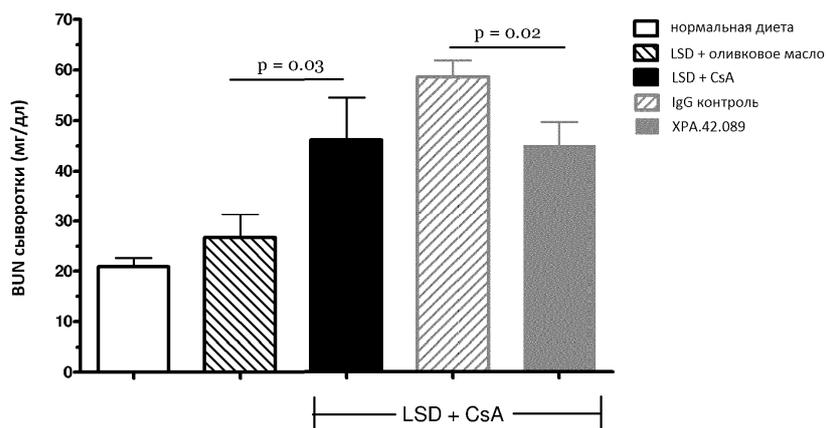
A



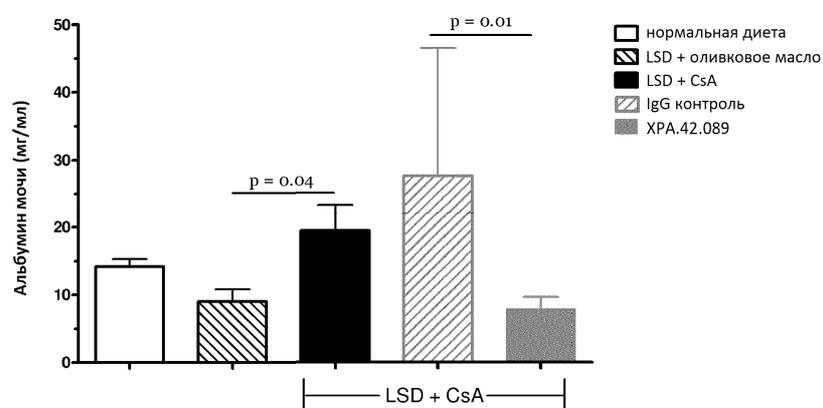
B



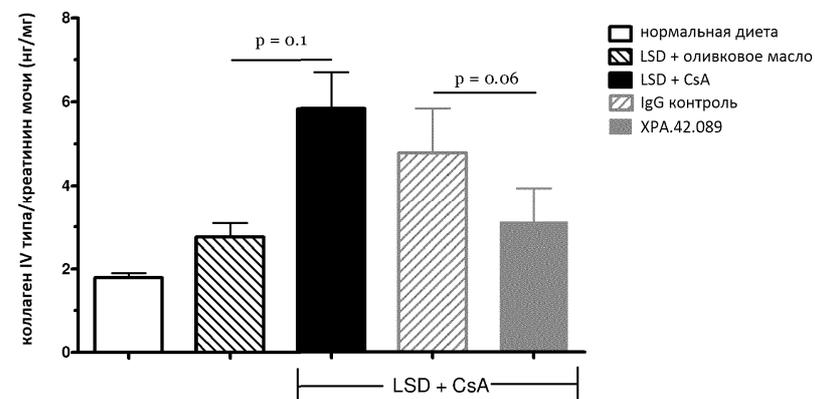
Фиг. 17



Фиг. 18

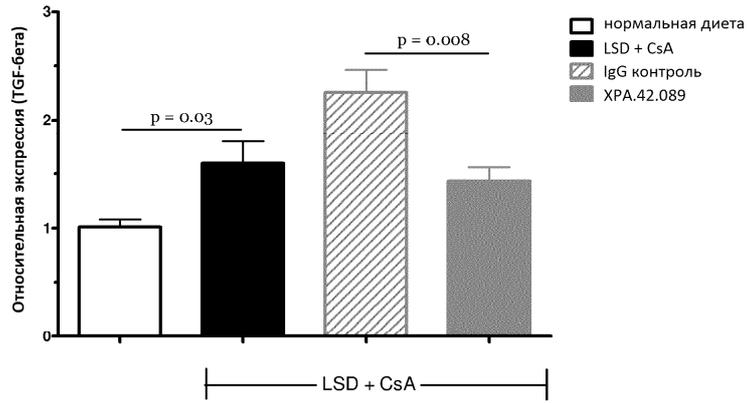


Фиг. 19

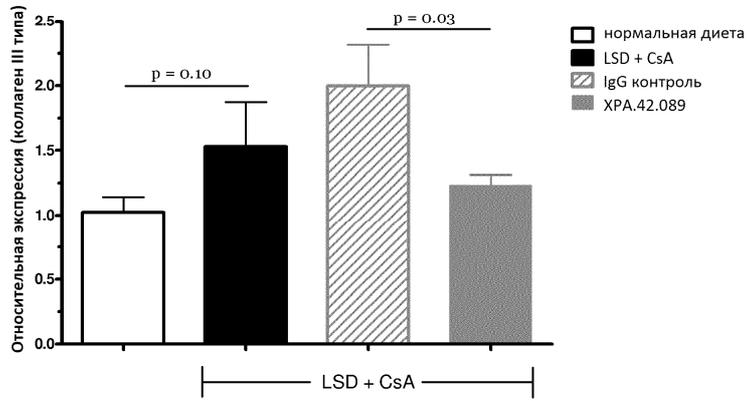


Фиг. 20

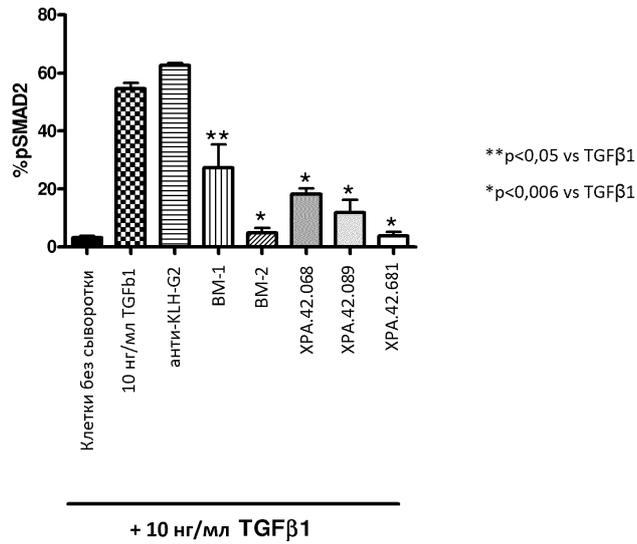
A



B



Фиг. 21



Фиг. 22

