

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046204**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.15

(21) Номер заявки
201990289

(22) Дата подачи заявки
2017.07.14

(51) Int. Cl. **A61K 38/18** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)

(54) КОМПЛЕКСНО-СЕЛЕКТИВНЫЕ АНТИТЕЛА К proTGFβ1-GARP, СПОСОБЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/362,393; 62/371,355

(32) 2016.07.14; 2016.08.05

(33) US

(43) 2019.06.28

(86) PCT/US2017/042162

(87) WO 2018/013939 2018.01.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СКОЛАР РОК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Карвен Грегори Дж., Шурпф Томас,
Тернер Кэтрин (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,
Соколов Р.А. (RU)**

(56) WO-A2-2015171691

WO-A2-2007014162

WO-A1-2014055648

CUENDE et al. "Monoclonal Antibodies Against GARP/TGF-β1 Complexes Inhibit the Immunosuppressive Activity of Human Regulatory T Cells in Vivo", *Science Translational Medicine*, 22 April 2015 (22.04.2015), Vol. 7, Iss. 284, P. 1-13, entire document

US-A1-20060246071

US-A1-20110189082

US-A1-20080219979

TRAN et al. "GARP (LRRC32) is Essential for the Surface Expression of Latent TGF-β on Platelets and Activated FOXP3+ Regulatory T Cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 11 August 2009 (11.08.2009), Vol. 106, P. 3445-3450, entire document

(57) Антитела, селективные к комплексу ProTGFβ1-GARP, полинуклеотиды, способные кодировать антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающие фрагменты, клетки, экспрессирующие антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающие фрагменты, а также ассоциированные векторы и меченные с возможностью обнаружения антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающие фрагменты, могут быть использованы для усиления иммунного ответа у субъекта, например, против рака.

B1

046204

046204 B1

Перечень последовательностей

Изобретение содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 10 июля 2017 г., называется JBI5093_SL.txt и имеет размер 27577 байт.

Область техники

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, которые ингибируют активность фактора роста, и способам получения и применения описываемых антител.

Предпосылки создания изобретения

Регуляторные Т-клетки, или Treg, представляют собой подгруппу лимфоцитов CD4+T, специализированных на ингибировании иммунных ответов. Недостаточная активность Treg обеспечивает аутоиммунную патологию, в то время как чрезмерная активность Treg может ингибировать противоопухолевые иммунные ответы у пациентов, страдающих раком. Точные механизмы, посредством которых Treg ингибируют иммунные ответы, полностью не изучены.

В связи с их функцией иммунодепрессантов, Treg представляют собой потенциальные ингибиторы спонтанных или индуцируемых вакциной иммунных противоопухолевых ответов. В мышинных моделях уменьшение численности Treg может улучшить иммунные ответы против экспериментальных опухолей (Colombo et al. Nat. Rev. Cancer 2007, 7:880-887). Таким образом, нацеливание Treg у людей может улучшить эффективность иммунотерапии против рака.

TGF- β 1, которые играют важную роль в активации человеческих Treg, но не других типов человеческих Т-лимфоцитов (Stockis, J. et al. Eur. J. Immunol. 2009, 39:869-882), могут представлять интерес. Тем не менее, антитела против hTGF β 1 не считаются многообещающими. Клинические исследования фазы I были проведены для фокально-сегментарного гломерулосклероза (FSGS), идиопатического легочного фиброза (IPF) и прогрессирующей злокачественной меланомы или почечное-клеточной карциномы (RCC) (Lonning S et al. Current Pharmaceutical Biotechnology 2011, 12:2176-2189). В зависимости от испытания у некоторых пациентов наблюдались побочные эффекты. Основные побочные эффекты, о которых сообщалось, заключались в развитии кератоакантомы (КА) и плоскоклеточной карциномы (SCC) у пациентов с меланомой. Возможно, что поражения КА или SCC у пациентов с меланомой развивались из предраковых клеток, пролиферация которых ингибируется эндогенным TGF- β 1 (Lonning S et al. Current Pharmaceutical Biotechnology 2011, 12:2176-2189). Следовательно, одной из главных проблем использования антител к TGF- β 1 в отношении рака является то, что они могут способствовать появлению новых опухолевых поражений, вследствие ингибирования противоопухолевого эффекта, обеспечиваемого эндогенным TGF- β 1 в отношении предраковых клеток. Таким образом, необходимы новые стратегии для улучшения лечения рака посредством предупреждения высвобождения TGF- β 1 из Treg.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение включает в себя антитела, селективные к комплексу proTGF β 1-GARP и их антигенсвязывающие фрагменты. Также описаны родственные полинуклеотиды, способные кодировать представленные комплексно-селективные антитела proTGF β 1-GARP и антигенсвязывающие фрагменты, клетки, экспрессирующие представленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, а также связанные векторы и помеченные с возможностью обнаружения комплексно-селективные антитела proTGF β 1-GARP и антигенсвязывающие фрагменты. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связывается селективно с доменом фактора роста TGF β 1, доменом фактора роста TGF β 2, доменом фактора роста TGF β 3, proTGF β 1, ковалентно связанным с LTBP1, proTGF β 1, ковалентно связанным с LTBP3, proTGF β 1, ковалентно связанным с LRRC33, и proTGF β 1, который не связан с человеческим GARP, что определено посредством OctetRed_384 в условиях, показанных в примерах 4-6.

В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут иметь следующее: (1) константу диссоциации (Kd) не более 1 нМ для человеческого proTGF β 1 в комплексе с повторениями человеческого гликопротеина А (комплекс proTGF β 1-GARP) в растворе; (2) ингибирующую концентрацию (IC50) не более 10 нМ для ингибирования высвобождения фактора роста TGF β 1 из связанного с клетками комплекса proTGF β 1-GARP; и (3) более чем 100-кратную селективность к комплексу proTGF β 1-GARP относительно домена фактора роста TGF β 1, домена фактора роста TGF β 2, домена фактора роста TGF β 3, proTGF β 1, ковалентно связанного с LTBP1, proTGF β 1, ковалентно связанного с LTBP3, proTGF β 1, ковалентно связанного с LRRC33, где выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты не связываются с proTGF β 1, который не связан с человеческим GARP.

Более того, описаны способы применения представленных антител, селективных к комплексу proTGF β 1-GARP, и антигенсвязывающих фрагментов. Описанные антитела, селективные к комплексу proTGF β 1-GARP, можно применять в способах лечения различных заболеваний или расстройств, связанных с TGF β 1, в которых необходимо модулировать иммунный ответ, например, различных способах иммунотерапии, например, при раковых заболеваниях, вакцинации и инфекционном заболевании.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает выделенные антитела и

антигенсвязывающие фрагменты, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с человеческим proTGFβ1 в комплексе с преимущественными повторами человеческого гликопротеина А (комплекс proTGFβ1-GARP), тогда как указанный комплекс находится в растворе. Данные антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или их антигенсвязывающие фрагменты могут ингибировать функцию Treg in vitro. В некоторых вариантах осуществления антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, и антигенсвязывающие фрагменты ингибируют активацию TGFβ1. В некоторых вариантах осуществления антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, и антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом человеческого proTGFβ1, модифицированного в результате образования комплекса с человеческим GARP. Данное антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с proTGFβ1 комплекса proTGFβ1-GARP с аффинностью связывания 880 пМ или менее.

Таблица 1

Последовательности CDR человеческих антител, селективных к комплексу proTGFβ-GARP (SEQ ID NO:)

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
4B1c1	DYTMH (4)	LISWDGGSTYYADSVKG (5)	DADDSTFDI (6)	RASQSVSRNLA (7)	WASTRES (8)	QQYYSVPYT (9)
4B16B9	SYAIS (10)	GIIPMFGTNYAQKFQG (11)	DREWEPAYGMDV (12)	IGTSSDVGGYN YVS (13)	DVSNRPS (14)	SAYTVSSTWV (15)

В некоторых вариантах осуществления антитела, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любой из аминокислотных последовательностей, описанных в табл. 1, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любой из аминокислотных последовательностей, описанных в табл. 1. Антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, по настоящему изобретению могут представлять собой переменные области тяжелой цепи последовательностей SEQ ID NO: 16 и 18 и могут содержать переменные области легкой цепи последовательностей SEQ ID NO 17 и 19.

Антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, описанные в данном документе, включают в себя антитела с описанными свойствами CDR и переменных доменов в комбинации с любым из изотипов IgG, включая модифицированные версии, в которых последовательность Fc модифицирована с целью влияния на различные эффекторные функции.

Наряду с описанными антителами, селективными к комплексу proTGFβ1-GARP, и антигенсвязывающими фрагментами также предлагаются полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, и антигенсвязывающие фрагменты. Также предлагаются векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе. Кроме того, описаны клетки, способные экспрессировать описанные векторы. Эти клетки могут представлять собой клетки млекопитающих (например, клетки 293F, клетки CHO), клетки насекомых (например, клетки Sf9), клетки дрожжей, клетки растений или бактериальные клетки (например, E. coli). Также приводится процесс продукции описанных антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающих фрагментов.

В настоящем изобретении также представлены способы применения антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающих фрагментов. Антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, для применения в способах, описанных в данном разделе, включают имеющие набор CDR, описанный для антител в табл. 1. Например, ключевая роль, которую играет TGFβ1 в иммунном ответе, делает его привлекательной мишенью для иммунотерапии, в том числе путем индукции или усиления иммунного ответа в отношении любого слабо иммуногенного антигена, в том числе опухолевых антигенов. Таким образом, антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, находят применение в лечении различных форм рака и инфекционных заболеваний.

В одном варианте осуществления антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, вводят для блокирования высвобождения TGFβ1 из Treg и таким образом предотвращения ингибирования эффекторной активности Т-клеток регуляторными Т-клетками. Анализ такого ингибирования может производиться самыми различными способами, известными специалистам в области, в том числе, например, посредством контроля пролиферации Т-клеток, экспрессии известных маркеров активации или секреции цитокинов. В другом варианте осуществления антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP вводят субъекту для снижения уровня регуляторных Т-клеток, например уровня опухолевых регуляторных Т-клеток. В еще одном варианте осуществления активность эффекторных Т-клеток индуцируется или усиливается посредством введения антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, как описано в настоящем документе.

В рамках настоящего изобретения представлены наборы, в том числе раскрытые антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или их антигенсвязывающие фрагменты. Описанные наборы можно использовать для осуществления способов применения антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем документе, или других спосо-

бов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления описанные наборы могут включать антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, и реагенты для применения в определении в присутствия комплекса proTGFβ1-GARP в биологическом образце и необязательно сосуде для содержания антитела, селективного к комплексу proTGFβ1-GARP, или фрагмента в отсутствие применения, инструкции по применению антитела, селективного к комплексу proTGFβ1-GARP, или фрагмента, антитела, селективного к комплексу proTGFβ1-GARP, или фрагмента, прикрепленного к твердой подложке, и/или помеченные с возможностью обнаружения формы антитела, селективного к комплексу proTGFβ1-GARP, или фрагмента.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показано, что добавление 4B1C1 и 4B16B9 к совместным культурам Т-клеток ингибирует Т-регуляторную клеточную активность посредством усиленного роста эффекторных Т-клеток.

На фиг. 2 показано, что 4B1C1 и 4B16B9 ингибируют активацию TGFβ1 согласно оценке посредством сигнализирования SMAD.

На фиг. 3 показано дозозависимое ингибирование активности TGFβ1 посредством 4B1C1 и 4B16B9.

Фиг. 4. Результаты октетной аффинности для кандидатов антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, демонстрируют специфичность посредством связывания с человеческим комплексом proTGFβ1-GARP, но не с другими proTGFβ1-комплексами или растворимыми формами TGFβ1, 2 или 3.

Подробное описание иллюстративных вариантов осуществления

Определения.

В настоящем описании и формуле изобретения используются различные термины, относящиеся к аспектам описания. Такие термины должны иметь обычное для них значение в данной области, если не указано иное. Другие конкретно определенные термины следует толковать согласно приведенным в настоящем документе определениям.

При использовании в этом описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают и множественное число, если содержание текста ясно не указывает на иное. Так, например, ссылка на "клетку" включает в себя комбинацию двух или более клеток и т.п.

В контексте настоящего документа термин "около" при указании измеримой величины, такой как количество, продолжительность во времени и т.п., считается охватывающим отклонения до ±10% от указанного значения, поскольку такие отклонения приемлемы для реализации описанных способов. Если не указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов, характеристик, таких как молекулярная масса, условий реакции и т.п., используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином "около". Соответственно, если не указано противоположное, числовые параметры, указанные в последующем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приближенными значениями, которые могут варьироваться в зависимости от нужных свойств, которые требуется получить посредством настоящего изобретения. В самом крайнем случае, но не в качестве попытки ограничить применение теории эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый числовой параметр должен по меньшей мере рассматриваться с учетом числа представленных значащих цифр и с использованием стандартных методик округления.

Хотя числовые диапазоны и параметры, устанавливающие широкий объем объекта изобретения, являются приближительными, числовые значения, указанные в конкретных примерах, представлены настолько точно, насколько это возможно. Однако любое числовое значение по своей природе содержит определенные ошибки, неизбежно вытекающие из стандартного отклонения, обнаруживаемого при соответствующих тестовых измерениях.

Термин "выделенный" означает, что биологический компонент (например, нуклеиновая кислота, пептид или белок) был по существу отделен, получен отдельно от или очищен от других биологических компонентов организма, в котором компонент встречается в природе, т.е. от других хромосомных и внехромосомных ДНК, РНК и белков. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были "выделены", включают в себя нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. "Выделенные" нуклеиновые кислоты, пептиды и белки могут быть частью композиции и все еще считаться выделенными, если такая композиция не является частью исходной среды нуклеиновой кислоты, пептида или белка. Термин также включает в себя нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные путем рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты. В настоящем документе термин "выделенное" антитело или антигенсвязывающий фрагмент означает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые по существу не содержат других антител или антигенсвязывающих фрагментов, имеющих другие антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое представляет собой антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP по сути не содержит антитела, которые не являются антителами, селективными к комплексу proTGFβ1-GARP).

В данном документе термин "трансформирующий фактор роста бета-1" и "TGFβ1" специфично связывается с человеческим TGFβ1-белком. В научной литературе TGFβ1 также известен, как TGFβ1 и

TGFβ1. Фактор роста TGFβ1 синтезируется в совокупности с продоменом, например, как описано в NCBI иллюстративной последовательности GenBank™ номер доступа AK291907: NP_000651.3.1 и UniProtKB/учетный номер Swiss-Prot P01137.2 (см. также Derynck et al. 1985, Nature 316, 701-705). В конкретном варианте осуществления транслированный белок TGFβ1 представляет собой человеческий белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2. TGFβ1, который включает элементы как продомена, так и фактора роста, называется "proTGFβ1". В некоторых вариантах осуществления proTGFβ1 включает в себя компоненты продомена и фактора роста, которые были протеолитически разделены, но которые остаются связанными посредством одного или нескольких химических взаимодействий. Такие химические взаимодействия могут включать в себя без ограничения гидрофобные связи, взаимодействия, обусловленные Ван-дер-Ваальсовыми силами, полярные и ионные взаимодействия, водородные связи и нековалентные связи.

В настоящем документе термины "преимущественные повторы гликопротеина А" и "GARP" относятся к общему GARP. GARP в других случаях известен как обогащенный лейцином содержащий повтор белок 32 (Irc32) и гарпин. В иллюстративной последовательности NP_001122394.1 и NP_005503.1 в NCBI представлены аминокислотные иллюстративные человеческие аминокислотные последовательности GARP. В конкретном варианте осуществления GARP представляет собой GARP человека с SEQ ID NO: 1.

"Антителом" называются все изоформы иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD и IgY), включая различные мономерные, полимерные и химерные формы, если иное не указано особо. В частности, термин "антитело" охватывает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb) и антителоподобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела.

"Антигенсвязывающие фрагменты" представляют собой любую белковую структуру, способную проявлять аффинность связывания с конкретным антигеном. Антигенсвязывающие фрагменты включают в себя фрагменты, полученные любым известным методом, например ферментативным расщеплением, пептидным синтезом и рекомбинантными методами. Некоторые антигенсвязывающие фрагменты состоят из частей интактных антител, сохраняющих антигенсвязывающую специфичность исходной молекулы антитела. Например, антигенсвязывающие фрагменты могут содержать по меньшей мере одну переменную область (вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи) или одну или более областей CDR антитела с известным связыванием с конкретным антигеном. Примеры приемлемых антигенсвязывающих фрагментов включают в себя, без ограничений, диатела и одноцепочечные молекулы, а также молекулы Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc и Fv, одноцепочечные (Sc) антитела, отдельные легкие цепи антител, отдельные тяжелые цепи антител, химерные слияния цепей антител или CDR с другими белками, белковые каркасы, мономеры или димеры тяжелых цепей, мономеры или димеры легких цепей, димеры, состоящие из одной тяжелой и одной легкой цепи, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или одновалентное антитело, описанное в WO2007059782, двухвалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области, Fd-фрагмент, состоящий по существу из доменов V.sub.H и C.sub.H1; Fv-фрагмент, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела, dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), который состоит по существу из домена VH и также называется доменным антителом (Holt et al.; Trends Biotechnol. 2003 Nov.; 21(11):484-90); антитело верблюжьего типа (камельид) или нанотела (Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan.; 5(1):11-24); выделенные области, определяющие комплементарность (CDR), и т.п. Для получения антигенсвязывающих фрагментов можно использовать все изоформы антител. Кроме того, антигенсвязывающие фрагменты могут включать в себя неантительные белковые каркасы, в которые могут успешно встраиваться полипептидные сегменты в ориентации, придающей аффинность к данному интересующему антигену, такие как белковые каркасы. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены рекомбинантным способом или в результате ферментативного или химического расщепления интактных антител. Фраза "антитело или его антигенсвязывающий фрагмент" может использоваться для обозначения того, что данный антигенсвязывающий фрагмент включает в себя один или более аминокислотных сегментов антитела, относящегося к указанной фразе.

Термины "CDR" и множественное число для "CDR" относятся к определяющей комплементарность области (CDR), при этом три такие области определяют связывающий характер переменной области легкой цепи (CDRL1, CDRL2 и CDRL3), и три определяют связывающий характер переменной области тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2 и CDRH3). CDR вносят вклад в функциональную активность молекулы антитела и разделены аминокислотными последовательностями, которые включают скелетные или каркасные области. Точное определение границ и протяженности CDR зависит от различных систем классификации и нумерации. Поэтому CDR можно различать с помощью нумераций по системе Kabat, Chothia, контактными или любым другим граничным определениям. Несмотря на различные границы, каждая из таких систем отличается определенной степенью перекрытия в той части, которая составляет так называемую "гипервариабельную область" в пределах переменной последовательности. Таким образом, определения CDR в соответствии с такими системами могут отличаться по длине и граничным областям относительно прилегающей каркасной области. См., например, Kabat et al., Sequences of Proteins

of Immunological Interest, 5th ed. NIH Publication No. 91-3242 (1991); Chothia et al., "Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196: 901 (1987); and MacCallum et al., "Antibody-Antigen Interactions: Contact Analysis and Binding Site Topography," J. Mol. Biol. 262:732 (1996)), каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Как правило, CDR образуют петлевую структуру, которая может классифицироваться как каноническая структура. Термин "каноническая структура" относится к конформации главной цепи, которую принимают антигенсвязывающие петли (CDR). В результате сравнительных структурных исследований было обнаружено, что пять из шести антигенсвязывающих петель обладают лишь ограниченным набором доступных конформаций. Каждую каноническую структуру можно охарактеризовать с помощью торсионных углов полипептидной основной цепи. Поэтому соответствующие петли между антителами могут иметь весьма сходные трехмерные структуры, несмотря на высокий уровень варибельности аминокислотной последовательности в большинстве участков петель (Chothia et al., "Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196: 901 (1987); Chothia et al., "Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions," I 342:877 (1989); Martin and Thornton, "Structural Families in Loops of Homologous Proteins: Automatic Classification, Modelling and Application to Antibodies," J. Mol. Biol. 263:800 (1996)), каждая из которых полностью включена путем ссылки. Более того, существует определенная взаимосвязь между сформированной петлевой структурой и окружающими ее аминокислотными последовательностями. Конформация определенного канонического класса определяется длиной цепи и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях в петле, а также в пределах консервативного каркаса (то есть вне петли). Поэтому отнесение к конкретному каноническому классу может производиться на основании наличия таких ключевых аминокислотных остатков.

Термин "полипептид" используется взаимозаменяемо с термином "белок" и в своем наиболее широком смысле относится к соединению с двумя или более субъединичными аминокислотами, аминокислотными аналогами или пептидомиметиками. Субъединицы могут быть связаны пептидными связями. В другом варианте осуществления субъединица может быть связана другими связями, например сложноэфирными, эфирными и пр. При использовании в настоящем документе термин "аминокислота" относится к природным и/или искусственным, или синтетическим аминокислотам, включая глицин, а также D и L оптические изомеры, аналоги аминокислот и пептидомиметики. Пептид, состоящий из трех или более аминокислот, обычно называют олигопептидом, если пептидная цепочка достаточно короткая. Если пептидная цепь является длинной, то пептид обычно называют полипептидом или белком.

Термины "специфически связывается", или "связывается специфически", или их производные при использовании применительно к антителам и фрагментам антител представляют связывание посредством доменов, кодируемых генами или фрагментами генов иммуноглобулинов, с одним или более эпитопами интересующего белка и, предпочтительно, отсутствие связывания с другими молекулами в пробе, содержащей смешанную популяцию молекул. Как правило, антитело связывается с родственным антигеном с K_d менее около 1×10^{-8} М, по результатам измерения в анализе по методу поверхностного плазмонного резонанса или анализа связывания с клетками. В предпочтительном варианте осуществления специфичность связывания измеряют с использованием интерферометрии биослоя. Такие фразы, как "[антиген]-специфическое" антитело означают, что упомянутое антитело специфически связывается с упомянутым антигеном.

Термин "полинуклеотид", который является синонимом термину "молекула нуклеиновой кислоты", "нуклеотиды" или "нуклеиновые кислоты", относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. "Полинуклеотиды" включают, без ограничений, одно- и двухцепочечные ДНК, ДНК, являющиеся смесью одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечные РНК, РНК, являющиеся смесью одно- и двухцепочечных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, более типично, двухцепочечными, или представлять собой смесь одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, "полинуклеотидом" называют трехцепочечные области, содержащие РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Термин "полинуклеотид" также включает в себя ДНК или РНК, содержащую одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с основными целями, модифицированными для стабильности или для других целей. "Модифицированные" основания включают в себя, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; следовательно, термин "полинуклеотид" охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, обычно встречающиеся в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. Термин "полинуклеотид" также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

"Вектор" представляет собой репликон, такой как плаزمид, фаг, космида или вирус, в который может быть функционально вставлен другой нуклеотидный сегмент так, чтобы происходила репликация или экспрессия указанного сегмента.

Используемый в настоящем документе термин "клетка-хозяин" может относиться к любому типу клетки, например к первичной клетке, клетке в культуре или клетке из клеточной линии. В конкретных

вариантах осуществления термин "клетка-хозяин" относится к клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, и к потомкам или к потенциальным потомкам такой клетки. Потомки такой клетки могут не быть идентичными родительской клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, например по причине мутаций или воздействия окружающей среды, которые могут проявляться в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина. Термины "экспрессия" и "продукция" используются в настоящем документе как синонимы и обозначают биосинтез продукта гена. Эти термины охватывают транскрипцию гена в РНК. Эти термины также охватывают трансляцию РНК в один или более полипептидов и дополнительно охватывают все посттранскрипционные и посттрансляционные модификации природного происхождения. Экспрессия или продукция антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может происходить внутри цитоплазмы клетки или во внеклеточной среде, например в ростовой среде для культивирования клеток. Значение термина "по существу такой же" может отличаться в зависимости от контекста, в котором он используется. Вследствие того, что в природной последовательности легких и тяжелых цепей и кодирующих их генов возможны вариации, как ожидается, можно встретить определенный уровень вариаций в пределах аминокислотных последовательностей или генов, кодирующих антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, которые практически не влияют на их уникальные свойства связывания (например, специфичность и аффинность). Такое ожидание отчасти обусловлено вырожденностью генетического кода, а также эволюционной успешностью консервативных вариантов аминокислотных последовательностей, которые ощутимо не меняют природу кодируемого белка. Соответственно, в контексте нуклеотидных последовательностей "по существу такой же" означает по меньшей мере 65% идентичность между двумя или более последовательностями. Предпочтительно термин относится к по меньшей мере 70% идентичности между двумя или более последовательностями, более предпочтительно по меньшей мере 75% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 80% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 85% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 90% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 91% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 92% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 93% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 94% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 96% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 97% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичности и более предпочтительно по меньшей мере 99% или более идентичности. Процентная идентичность между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % гомологии = кол-во идентичных положений/общее кол-во положений $\times 100$), принимая во внимание количество гэпов и длину каждого гэпа, вводимого для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процентную идентичность между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями можно определить, например, с помощью алгоритма, описанного в публикации E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988), который встроен в программу ALIGN (версия 2.0), используя весовую таблицу остатков PAM120 со штрафом за длину гэпа 12 и штрафом за гэп 4. Кроме этого, процентную идентичность двух аминокислотных последовательностей можно определить, используя алгоритм, описанный в публикации Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970).

Степень вариации, возможная в пределах аминокислотной последовательности белка без существенного влияния на функцию белка, намного ниже, чем в нуклеотидной последовательности, поскольку принципы вырожденности не применимы к аминокислотным последовательностям. Соответственно, в контексте антитела или антигенсвязывающего фрагмента "по существу такой же" относится к антителу или антигенсвязывающим фрагментам, имеющим 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность описанным антителам или антигенсвязывающим фрагментам. Другие варианты осуществления включают в себя антитела, селективные к комплексу proTGF β 1-GARP, или антигенсвязывающие фрагменты, которые имеют каркас, основу или другие несвязывающиеся области, которые не обладают существенной идентичностью с антителами, селективными к комплексу proTGF β 1-GARP, и антигенсвязывающими фрагментами, описанными в настоящем документе, но обязательно включают в себя одну или более CDR или других последовательностей, необходимых для осуществления связывания, которые обладают 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с последовательностями, описанными в настоящем документе.

"Аффинность связывания" обычно относится к прочности полной суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером связывания (например, антигеном). Если не указано иное, используемый в настоящем документе термин "аффинность связывания" относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между участниками пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y может обычно определяться константой диссоциации (K_D). Аффинность может измеряться и/или выражаться самыми различными способами, известными специалистам в области, в том числе, без ограничений, посредством равновесной константы диссоциации (K_D) и равновесной константы ассоциации (связывания) (K_A). K_D рассчитывается из отношения k_{off}/k_{on} , тогда как K_A рассчитывается из отноше-

ния k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, например, антитела с антигеном, а k_{off} относится к константе скорости диссоциации, например, антитела с антигеном. k_{on} и k_{off} могут определяться методами, известными специалистам в области, например, интерферометрии биослоя.

Термин "субъект" означает человека и не относящихся к человеку животных, включая всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, например нечеловекообразных приматов, мышей, кроликов, овец, собак, кошек, лошадей, коров, цыплят, амфибий и рептилий. Во многих вариантах осуществления описанных способов субъект представляет собой человека.

Антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, и антигенсвязывающие фрагменты.

В настоящем документе описываются выделенные моноклональные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые представляют собой антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP. Используемый в настоящем документе термин "антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP" относится к антителу с отличной аффинностью, специфичностью и активностью. Антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, могут иметь следующее: (1) константа диссоциации (K_d) не более 1 нМ для человеческого proTGFβ1, если proTGFβ1 находится в комплексе с человеческим GARP в растворе (например, по результатам измерения с использованием анализа, не включающего клетки); (2) ингибирующая концентрация (IC50) не более 10 нМ для ингибирования высвобождения фактора роста TGFβ1 из связанных с клетками комплексов proTGFβ1-GARP; (3) более чем 100-кратная селективность (по результатам измерения посредством аффинности связывания, т.е. значение K_d) для комплекса proTGFβ1-GARP по всему домену фактора роста TGFβ1, домену фактора роста TGFβ2, домену фактора роста TGFβ3, proTGFβ1, ковалентно связанному с LTBP1, proTGFβ1, ковалентно связанному с LTBP3, и proTGFβ1, ковалентно связанному с LRRC33; и (4) отсутствие аффинности для proTGFβ1, если он не связан в комплекс с GARP. В некоторых случаях антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP также имеют более чем 100-кратную селективность для комплекса proTGFβ1-GARP по всему proTGFβ1, ковалентно связанному с LTBP2 и/или LTBP4. Общая структура молекулы антитела содержит антигенсвязывающий домен, включающий в себя тяжелую и легкую цепи, и Fc-домен, который выполняет различные функции, включая фиксацию комплемента и связывание с рецепторами антител.

К описанным антителам, селективным к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающим фрагментам относятся все изотипы, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и синтетические мультимеры четырехцепочечной структуры иммуноглобулинов. Описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты также включают изотип IgY, по существу обнаруживаемый в сыворотке курицы или индейки и в желтке яйца курицы или индейки.

Антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, и антигенсвязывающие фрагменты можно получать из любого вида, используя рекомбинантные методы. Например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой их мышинные, крысиные, козы, лошадиные, свиные, коровьи, куриные, кроличьи, верблюжьи, ослиные, человеческие или химерные варианты. В целях введения человеку антитела или антигенсвязывающие фрагменты, полученных не от человека, можно подвергнуть генетическому или структурному изменению, чтобы они были менее антигенны при введении пациенту-человеку.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты являются химерными. В настоящем документе термин "химерный" означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий по меньшей мере некоторую часть по меньшей мере одного варибельного домена, полученного из аминокислотной последовательности антитела не относящегося к человеку млекопитающего, грызуна или рептилии, в то время как оставшиеся части антитела или его антигенсвязывающего фрагмента имеют человеческое происхождение.

В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой гуманизированные антитела. Гуманизированные антитела могут представлять собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (например, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие субпоследовательности антител), содержащие минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина не относящегося к человеку животного. По большей части гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из области, определяющей комплементарность (CDR), реципиента заменены остатками из области, определяющей комплементарность, не относящегося к человеку вида (антитело-донор), например мыши, крысы или кролика, обладающей желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из, по меньшей мере одного, а обычно двух варибельных доменов, в которых все или по существу все CDR-области соответствуют таковым в иммуноглобулине от не относящегося к человеку животного, а все или по существу все каркасные области соответствуют таковым последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут иметь

различные формы, но будут включать в себя одну или более CDR антитела, как показано в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой человеческий IgG или его производные. Несмотря на то, что антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера в настоящем документе, являются человеческими, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера, можно подвергнуть химеризации.

В некоторых вариантах осуществления представлены антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, содержат тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, и антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 5, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 6, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 8, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9. Данное антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или антигенсвязывающий фрагмент может содержать человеческие каркасные последовательности. Данное антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или антигенсвязывающий фрагмент может связываться с proTGFβ1 из комплекса proTGFβ1-GARP с аффинностью 880 пМ или менее, может ингибировать функцию Treg *in vitro* и может ингибировать активацию TGFβ1. В некоторых вариантах осуществления антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, и антигенсвязывающие фрагменты содержат тяжелую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 16, и легкую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления proTGFβ1-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, по существу такая же или идентичная аминокислотной последовательности 1-118 SEQ ID NO: 16, и вариабельная область легкой цепи, по существу такая же или идентичная аминокислотной последовательности 1-107 SEQ ID NO: 17. Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи антител, описанных в настоящем абзаце, являются приемлемыми для введения в биспецифические конструкторы, в которых одно плечо представляет собой плечо антитела, селективного к комплексу proTGFβ1-GARP.

В некоторых вариантах осуществления антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, и антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 10, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 11, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 12, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 13, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 14, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15. Данное антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или антигенсвязывающий фрагмент может содержать человеческие каркасные последовательности. Данное антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или антигенсвязывающий фрагмент может связываться с proTGFβ1 из комплекса proTGFβ1-GARP с аффинностью 880 пМ или менее, может ингибировать функцию Treg *in vitro* и может ингибировать активацию TGFβ1. В некоторых вариантах осуществления антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, и антигенсвязывающие фрагменты содержат тяжелую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 18, и легкую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления proTGFβ1-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, по существу такая же или идентичная аминокислотной последовательности 1-121 SEQ ID NO: 18, и вариабельная область легкой цепи, по существу такая же или идентичная аминокислотной последовательности 1-110 SEQ ID NO: 19. Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи антител, описанных в настоящем абзаце, являются приемлемыми для введения в биспецифические конструкторы, в которых одно плечо представляет собой плечо антитела, селективного к комплексу proTGFβ1-GARP.

Комплекс-селективного антитела proTGFβ1-GARP и антигенсвязывающие фрагменты могут иметь аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 70% идентичные, по меньшей мере на 75% идентичные, по меньшей мере на 80% идентичные, по меньшей мере на 85% идентичные, по меньшей мере на 90% идентичные, по меньшей мере на 91% идентичные, по меньшей мере на 92% идентичные, по меньшей мере на 93% идентичные, по меньшей мере на 94% идентичные, по меньшей мере на 95% идентичные, по меньшей мере на 96% идентичные, по меньшей мере на 97% идентичные, по меньшей мере на 98% идентичные, по меньшей мере на 99% или более идентичные с CDR аминокислотных последовательностей в SEQ ID NO: 4-15 и вариабельной областью аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 16-19.

Также описаны выделенные полинуклеотиды, которые кодируют антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим описанием. Выделенные полинуклеотиды, способные кодировать сегменты вариабельных доменов, предлагаемые в на-

стоящем документе, можно включать в одни и те же или разные векторы для продукции антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантные антигенсвязывающие белки, также входят в объем описания. В некоторых вариантах осуществления описанные полинуклеотиды (и пептиды, которые они кодируют) включают в себя лидерную последовательность. Можно использовать любую лидерную последовательность, известную в данной области. Лидерная последовательность может включать в себя, без ограничений, сайт рестрикции или сайт инициации трансляции.

Антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, включают в себя варианты, имеющие одиночные или множественные аминокислотные замены, делеции или присоединения, сохраняющие биологические свойства (например, аффинность связывания или иммунную эффекторную активность) описанных антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающих фрагментов. Такие варианты могут включать в себя: (a) варианты, в которых один или более аминокислотных остатков заменяются консервативными или неконсервативными аминокислотами, (b) варианты, в которых одна или более аминокислот присоединяются к полипептиду или удаляются из него, (c) варианты, в которых одна или более аминокислот включают в себя группу-заместитель, и (d) варианты, в которых полипептид сливается с другим пептидом или полипептидом, таким как партнер слияния, белковая метка или другая химическая функциональная группа, способная придавать полипептиду полезные свойства, например, эпитоп для антитела, полигистидиновая последовательность, остаток биотина и т.п. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут включать в себя варианты, в которых аминокислотные остатки одного вида заменены соответствующими остатками другого вида (в консервативных или неконсервативных положениях). В других вариантах осуществления аминокислотные остатки в неконсервативных положениях замещены консервативными или неконсервативными остатками. Методики получения таких вариантов, включая генетические (делеции, мутации и т.п.), химические и ферментативные, известны специалистам в данной области.

Антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут относиться к нескольким изотипам антител, таким как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В некоторых вариантах осуществления изотип антитела представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно изотип IgG1. Специфичность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по большей части определяется аминокислотной последовательностью и расположением CDR. Следовательно, CDR одного изотипа можно переносить на другой изотип без изменения антигенной специфичности. В альтернативном варианте осуществления были установлены методики, вызывающие переключение гибридом с выработки одного изотипа антител на другой (переключение изотипа) без изменения антигенной специфичности. Соответственно, такие изотипы антител входят в объем описанных антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Описанные в настоящем документе антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающие фрагменты имеют такие аффинности связывания с proTGFβ1 в комплексе proTGFβ1-GARP, которые содержат константу диссоциации (K_D) менее приблизительно 880 пМ. Аффинность описанных антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающих фрагментов может быть определена множеством способов, известных в данной области, таких как интерферометрия биослоя, метод поверхностного плазмонного резонанса или способы, основанные на ELISA. Анализы для измерения аффинности посредством интерферометрии биослоя включают анализы, осуществленные с использованием OctetRed 384, когда анализ осуществляли при комнатной температуре (например при температуре 25°C или около), причем антитело, способное к связыванию с proTGFβ1 из комплекса proTGFβ1-GARP, зафиксированного на биотинилированном комплексе proTGFβ1-GARP.

Кроме того, предлагаются векторы, содержащие полинуклеотиды, описанные в настоящем документе. Векторы могут представлять собой экспрессионные векторы. Следовательно, рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие последовательность, кодирующую интересующий полипептид, считаются входящими в объем данного описания. Экспрессионный вектор может содержать одну или более дополнительных последовательностей, например, без ограничений, регуляторные последовательности (например, промотор, энхансер), маркер селекции и сигнал полиаденилирования. Векторы для трансформации широкого спектра клеток-хозяев широко известны, и к ним относятся, без ограничений, плазмиды, фагмиды, космиды, бакуловирусы, бакмиды, искусственные бактериальные хромосомы (BAC), искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), а также другие бактериальные, дрожжевые и вирусные векторы.

К рекомбинантным экспрессионным векторам, входящим в объем описания, относятся синтетические, геномные или происходящие от кДНК фрагменты нуклеиновых кислот, которые кодируют по меньшей мере один рекомбинантный белок, который может быть функционально связан с приемлемыми регуляторными элементами. К таким регуляторным элементам могут относиться промотор транскрипции, последовательности, кодирующие приемлемые участки связывания мРНК с рибосомой, и последовательности, контролирующие терминацию транскрипции и трансляции. Экспрессионные векторы, осо-

бенно экспрессионные векторы млекопитающих, также могут включать в себя один или более нетранскрибируемых элементов, например точку начала репликации, приемлемый промотор и энхансер, связанные с экспрессируемым геном, другие 5' или 3' фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, 5' или 3' нетранслируемые последовательности (например, необходимые участки связывания с рибосомой), сайт полиаденилирования, донорный и акцепторный сайты сплайсинга или последовательности терминации транскрипции. Кроме того, может быть встроена точка начала репликации, обеспечивающая способность к репликации в клетке-хозяине.

Последовательности контроля транскрипции и трансляции в экспрессионных векторах, предназначенных для трансформации клеток позвоночных, могут быть получены из вирусных источников. Примеры векторов, которые можно сконструировать, описаны в публикации Okayama and Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983).

В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент, помещают под контроль эффективного конститутивного промотора, такого как, например, промоторы следующих генов: гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), аденозиндезаминазы, пируваткиназы, бета-актина, человеческого миозина, человеческого гемоглобина, человеческого мышечного креатина и других. Кроме того, многие вирусные промоторы функционируют конститутивно в эукариотических клетках и являются приемлемыми для применения в описанных вариантах осуществления. К таким вирусным промоторам относятся, без ограничений, немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), ранний и поздний промоторы SV40, промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Малони, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса Эпштейна-Барр (EBV), вируса саркомы Рауса (RSV) и других ретровирусов и промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. В одном варианте осуществления кодирующую последовательность антитела, селективного к комплексу $\text{p}70\text{TGF}\beta 1\text{-GARP}$, или его антигенсвязывающего фрагмента помещают под контроль индуцибельного промотора, например, промотора металлотионеина, промотора, индуцируемого тетрациклином, промотора, индуцируемого доксициклином, промоторов, содержащих один или несколько стимулируемых интерфероном реагирующих элементов (ISRE), промоторы протеинкиназы R 2',5'-олигоаденилатсинтаз, генов Mx, ADAR1 и т.п.

Векторы, описанные в настоящем документе, могут содержать один или более участков внутренней посадки рибосомы (IRES). Включение последовательности IRES в слитые векторы может быть полезно для усиления экспрессии некоторых белков. В некоторых вариантах осуществления векторная система может включать в себя один или более участков полиаденилирования (например, SV40), которые могут находиться выше или ниже любой из вышеупомянутых последовательностей нуклеиновых кислот. Компоненты вектора могут быть шиты друг с другом или расположены так, чтобы обеспечить оптимальное разнесение в пространстве для экспрессии генных продуктов (т.е. путем введения "спейсерных" нуклеотидов между открытыми рамками считывания (ORF)), или расположены другим способом. Регуляторные элементы, такие как мотив IRES, также могут быть расположены с возможностью обеспечения оптимального разнесения в пространстве для экспрессии.

Векторы могут содержать селективные маркеры, хорошо известные в данной области. Селективные маркеры включают в себя маркеры положительной и отрицательной селекции, гены резистентности к антибиотикам (например, ген резистентности к неомицину, ген резистентности к гигромицину, ген резистентности к канамицину, ген резистентности к тетрациклину, ген резистентности к пенициллину), гены глутаматсинтазы, HSV-TK, производные HSV-TK для ганцикловирной селекции или ген бактериальной пуриноклеозидфосфорилазы для селекции по б-метилпурину (Gadi et al., 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000)); нуклеотидная последовательность, кодирующая селективный маркер или сайт клонирования, может располагаться выше или ниже нуклеотидной последовательности, кодирующей интересующий полипептид или сайт клонирования.

Векторы, описанные в настоящем документе, можно использовать для трансформации различных клеток генами, кодирующими описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Например, векторы можно использовать для получения клеток, продуцирующих антитело, селективное к комплексу $\text{p}70\text{TGF}\beta 1\text{-GARP}$, $\text{p}70\text{TGF}\beta 1\text{-GARP}$ или антигенсвязывающий фрагмент. Следовательно, в другом аспекте изобретения описаны клетки-хозяева, трансформированные векторами, содержащими нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с $\text{p}70\text{TGF}\beta 1$ из комплекса $\text{p}70\text{TGF}\beta 1\text{-GARP}$, например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные и подтвержденные примерами в настоящем документе.

В данной области известны многочисленные способы внедрения в клетки чужеродных генов, и их можно использовать для конструирования рекомбинантных клеток в целях осуществления описанных способов в соответствии с различными вариантами осуществления, описанными и подтвержденными примерами в настоящем документе. Используемая методика должна обеспечивать стабильный перенос гетерологичной последовательности гена в клетку-хозяина таким образом, чтобы гетерологичная последовательность гена могла наследоваться и экспрессироваться потомством клетки, и таким образом, чтобы не нарушалось необходимое развитие и физиологические функции клеток-реципиентов. К методикам,

которые можно использовать, относятся, без ограничений, перенос хромосом (например, слияние клеток, опосредованный хромосомами перенос генов, опосредованный микроклетками перенос генов), физические способы (например, трансфекция, слияние со сферопластом, микроинъекция, электропорация, липосомный носитель), вирусный перенос вектора (например, рекомбинантные ДНК-вирусы, рекомбинантные РНК-вирусы) и т.п. (описано в публикации Cline, 29 *Pharmac. Ther.* 69-92 (1985); для трансформации клеток также можно применять кальций-фосфатную преципитацию и индуцированное полиэтиленгликолем (ПЭГ) слияние бактериальных протопластов с клетками млекопитающих.

К клеткам, приемлемым для применения в экспрессии антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, предпочтительно относятся эукариотические клетки, более предпочтительно клетки, происходящие от растения, грызуна или человека, например, без ограничений, клеточные линии NSO, CHO, CHO-K1, perC.6, Tk-ts13, ВНК, клетки HEK293, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, L-клетки, C127, 3T3, HeLa, NS1, миеломные клетки Sp2/0, ВНК и т.п. Кроме того, экспрессию антител можно осуществлять с применением гибридомных клеток. Способы получения гибридом хорошо известны в данной области.

Клетки, трансформированные экспрессионными векторами, описанными в настоящем документе, можно подвергнуть селекции или скринингу для рекомбинантной экспрессии антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Положительные по рекомбинации клетки размножают и проводят скрининг субклонов, проявляющих нужный фенотип, например высокий уровень экспрессии, усиленные характеристики роста или способность вырабатывать белки с нужными биохимическими свойствами, например, вследствие модификации белков или видоизмененных посттрансляционных модификаций. Эти фенотипы могут быть обусловлены внутренними свойствами данного субклона или мутацией. Мутации можно осуществлять путем применения химических агентов, УФ-света, радиации, вирусов, инсерционных мутагенов, ингибирования восстановления ошибок спаривания ДНК или комбинации таких способов.

Способы применения антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, для лечения.

В настоящем документе предлагаются антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или их антигенсвязывающие фрагменты для применения в терапии. В частности, эти антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно применять при лечении рака. Как описано выше, активный TGFβ1, высвобожденный из Treg, ингибирует действия других Т-клеток. Таким образом, ингибирование TGFβ1-опосредованной иммуносупрессивной функции представляет собой привлекательный подход для повышения иммунного ответа против различных форм рака. Антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, могут использоваться для лечения как солидных опухолей, так и гематологических форм рака, включая лейкоз.

Антитела для применения в этих способах включают антитела, описанные выше в настоящем документе, такие как антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающий фрагмент со свойствами, описанными в табл. 1, например с последовательностями CDR или вариабельных доменов, которые также представлены в дальнейшем описании этих антител.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, иммуноэффektorные свойства антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, могут быть модулированы за счет модификаций Fc с помощью методик, известных специалистам в данной области. Например, эффекторные функции Fc-фрагмента, такие как связывание C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клетки; BCR) и т.п., могут обеспечиваться и/или управляться модифицирующими остатками в Fc-фрагменте, ответственными за эти действия.

"Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность", или ADCC, представляет собой клеточно-опосредованную реакцию, при которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие рецепторы Fc (FcRc) (например, естественные киллерные (ЕК) клетки, нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени.

Способность моноклональных антител индуцировать ADCC можно усилить путем конструирования их олигосахаридного компонента. IgG1 или IgG3 человека претерпевают N-гликозилирование по Asn297 большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Антитела, продуцируемые несконструированными клетками CHO, как правило, имеют содержание фукозы в гликанах по меньшей мере около 85%. Удаление центральной фукозы из олигосахаридов типа 2-антенарного комплекса, присоединенных к областям Fc, усиливает ADCC антител посредством улучшенного связывания Fc.гамма.RIIIa без изменения связывания с антигеном или CDC-активности. Такие mAb можно получать с помощью различных способов, которые, по имеющимся данным, приводят к успешной экспрессии антител с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антенарного комплекса, такими способами, как контроль осмоляльности культуральной среды (Konno et al., *Cytotechnology* 64:249-65, 2012), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO Lec13 (Shields et al., *J Biol Chem* 277:26733-26740, 2002), применение в качестве

линии клеток-хозяев вариантной линии клеток CHO EB66 (Olivier et al., MAbs; 2(4), 2010; электронное издание до печатного издания; PMID:20562582), применение крысиной гибридной клеточной линии YB2/0 в качестве линии клеток-хозяев (Shinkawa et al., J Biol Chem 278:3466-3473, 2003), введение малых интерферирующих РНК, особенно к гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) (Mori et al., Biotechnol Bioeng 88:901-908, 2004) или коэкспрессия бета-1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и альфа-маннозидазы II Гольджи или эффективного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунензина (Ferrara et al., J Biol Chem 281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., Biotechnol Bioeng 93:851-861, 2006; Xhou et al., Biotechnol Bioeng 99:652-65, 2008).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, ADCC, вызванную антителами, селективными к комплексу proTGFβ1-GARP, также можно усилить путем введения некоторых замен в Fc-область антитела. Примерами замен являются, например, замены в аминокислотных позициях 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 (нумерация остатков в соответствии с индексом ЕС), как описано в патенте США № 6,737,056.

Фармацевтические композиции и введение.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем документе, содержат: а) эффективное количество антитела, селективного к комплексу proTGFβ1-GARP, или фрагмента антитела по настоящему изобретению и б) фармацевтически приемлемый носитель, который может быть инертным или физиологически активным. В предпочтительных вариантах осуществления антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP представляет собой описанное выше антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или его антигенсвязывающий фрагмент. В настоящем документе термин "фармацевтически приемлемые носители" включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Примеры приемлемых носителей, разбавителей и/или эксципиентов включают в себя одно или более из воды, солевого раствора, фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), декстрозы, глицерина, этанола и т.п., а также любую их комбинацию. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, такие как сахара, многоатомные спирты или хлорид натрия. В частности, соответствующие примеры приемлемого носителя включают в себя: (1) фосфатно-солевой буферный раствор по Дульбекко, pH около 7,4, содержащий или не содержащий от около 1 мг/мл до 25 мг/мл человеческого сывороточного альбумина, (2) 0,9% солевой раствор (0,9% мас./об. хлорида натрия (NaCl)) и (3) 5% (мас./об.) декстрозу; и он также может содержать антиоксидант, такой как триптамин, и стабилизирующий агент, такой как Твин 20®.

Композиции, описанные в настоящем документе, также могут содержать дополнительный терапевтический агент, являющийся необходимым для конкретного подлежащего лечению расстройства. Предпочтительно, чтобы антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или фрагмент антитела и дополнительное активное соединение имели комплементарные виды активности, которые не влияют друг на друга отрицательным образом. В предпочтительном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, гистамина дигидрохлорид или интерлейкин 2. В предпочтительном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент.

Композиции изобретения могут быть представлены в различных формах. Эти формы включают в себя, например, жидкие, полутвердые и твердые дозированные формы, но предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и от терапевтического применения. Типичные предпочтительные композиции имеют форму растворов, пригодных для инъекции или инфузии. Предпочтительным способом введения является парентеральный (например, внутривенный, внутримышечный, интраперитонеальный, подкожный). В предпочтительном варианте осуществления выполняют внутривенное болюсное введение композиций изобретения, либо их вводят в виде непрерывной инфузии в течение некоторого периода времени. В другом предпочтительном варианте осуществления их вводят внутримышечно, подкожно, внутрисуставно, внутрь опухоли, около опухоли, в пораженную ткань или около пораженной ткани, чтобы они оказывали локальный и системный терапевтические эффекты.

Стерильные композиции для парентерального введения можно получать путем введения антитела, фрагмента антитела или конъюгата антитела настоящего изобретения в нужном количестве в подходящий растворитель с последующей стерилизацией посредством микрофльтрации. В качестве растворителя или носителя можно использовать воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, декстрозу, глицерин, этанол и т.п., а также их комбинацию. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, такие как сахара, многоатомные спирты или хлорид натрия. Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, в частности, смачивающие, изотонизирующие, эмульгирующие, диспергирующие и стабилизирующие агенты. Стерильные композиции для парентерального введения также можно получать в виде стерильных твердых композиций, растворяемых во время применения в стерильной воде или любой другой пригодной для инъекций стерильной среде.

Антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, или фрагмент антитела также можно вводить

перорально. В качестве твердых композиций для перорального применения можно использовать таблетки, пилюли, порошки (желатиновые капсулы, пакеты-саше) или гранулы. В этих композициях активный ингредиент в соответствии с изобретением в потоке аргона смешивают с одним или более инертными разбавителями, такими как крахмал, целлюлоза, сахароза, лактоза или диоксид кремния. Эти композиции также могут содержать вещества, отличные от разбавителей, например, одно или более смазывающих веществ, таких как стеарат магния или тальк, краситель, покрытие (таблетка с сахарным покрытием) или глазурь.

В качестве жидких композиций для перорального введения можно использовать фармацевтически приемлемые растворы, суспензии, эмульсии, сиропы и эликсиры, содержащие инертные разбавители, такие как вода, этанол, глицерин, растительные масла или парафиновое масло. Эти композиции могут содержать вещества, отличные от разбавителей, например, смачивающие вещества, подсластители, загустители, ароматизирующие или стабилизирующие продукты.

Дозы зависят от желаемого эффекта, продолжительности лечения и применяемого способа введения; они по существу составляют от 5 до 1000 мг в сутки перорально для взрослых, при разовых дозах в диапазоне от 1 до 250 мг активного вещества. В целом соответствующую дозировку определяет врач в зависимости от возраста, массы тела и других факторов, специфичных для подлежащего лечению субъекта.

В предпочтительном варианте осуществления антитела, селективные к комплексу proTGF β 1-GARP, или фрагменты антител изобретения применяют для лечения гиперпролиферативного расстройства у млекопитающих. В более предпочтительном варианте осуществления для лечения гиперпролиферативного расстройства у млекопитающих применяют одну из вышеописанных фармацевтических композиций, содержащих антитело, селективное к комплексу proTGF β 1-GARP, proTGF β 1-GARP или фрагмент антитела изобретения. В одном варианте осуществления расстройство представляет собой рак. Множество различных раковых опухолей, таких как рак надпочечников, анальный рак, рак мочевого пузыря, опухоль головного мозга, глиома, рак молочной железы, рак карциноидов, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак внепеченочных желчных протоков, опухоль Юинга, внекраниальная опухоль зародышевой клетки, рак глаза, рак желчного пузыря, рак желудка, опухоль зародышевой клетки, гестационная трофобластическая опухоль, рак головы и шеи, рак глотки, рак островковых клеток, рак почки, рак гортани, лейкоз, рак губ и полости рта, печень рак, рак легких, лимфома, меланома, мезотелиома, карцинома клеток Меркеля, плоскоклеточный рак головы и шеи, миелома, новообразование, рак носоглотки, нейробластома, рак ротовой полости, рак ротоглотки, остеосаркома, рак яичников, рак поджелудочной железы, синус и рак паращитовидной железы, рак полового члена, рак феохромоцитомы, рак гипофиза, новообразование плазмы, рак предстательной железы, рабдомиосаркома, рак прямой кишки, почечный рак Карцинома, рак слюнной железы, рак кожи, саркома Капоши, T-клеточная лимфома, саркома мягких тканей, рак желудка, рак яичка, тимома, рак щитовидной железы, рак уретры, рак матки, рак влагалища, рак вульвы или опухоль Вильмса может излечиваться антителами, описанными в данном документе.

При лечении любой из перечисленных выше форм рака предлагаемые способы лечения могут использоваться для дальнейшего подавления роста опухоли, индуцировать регрессию опухоли, увеличивать выживаемость без прогрессирования и/или продлевать общую выживаемость субъекта, страдающего от опухоли. В некоторых вариантах осуществления антитела, селективные к комплексу proTGF β 1-GARP, могут также отсрочивать или предотвращать начало метастазирования. Прогресс лечения может отслеживаться различными способами. Например, ингибирование может приводить к снижению размеров опухоли и/или уменьшать метаболическую активность в пределах опухоли. Оба этих параметра могут измеряться посредством, например, сканирования МРТ или ПЭТ. Ингибирование может также отслеживаться с помощью биопсии для подтверждения уровня некроза, гибели клеток опухоли и уровня васкуляризации в пределах опухоли. Степень метастазирования может отслеживаться посредством известных способов. Соответственно, фармацевтические композиции изобретения применяются для лечения или предупреждения метастазирования при различных формах рака, включая без ограничений рак молочной железы, рак простаты, эндометриальный рак, рак мочевого пузыря, рак почек, рак пищевода, рак яичек, рак яичников, плоскоклеточную карциному (например, плоскоклеточную карциному головы и шеи - SCCHN), увеальную меланому, фолликулярную лимфому, рак шейки матки, рак головного мозга, рак поджелудочной железы, рак печени, лимфому, болезнь Ходжкина, множественную миелому, рак ЖКТ и астроцитарный рак.

Аналогично в настоящем документе дополнительно предлагается способ ингибирования роста выбранных популяций клеток, включающий приведение экспрессирующих TGF β 1 иммунных клеток в контакт с эффективным количеством антитела, селективного к комплексу proTGF β 1-GARP, или фрагмента антитела настоящего изобретения, отдельно или в комбинации с другими терапевтическими агентами. В предпочтительных вариантах осуществления антитело, селективное к комплексу proTGF β 1-GARP, proTGF β 1-GARP представляет собой описанное выше антитело, селективное к комплексу proTGF β 1-GARP, proTGF β 1-GARP или его антигенсвязывающий фрагмент. В предпочтительном варианте осуще-

ствления дополнительным терапевтическим агентом является иммунотерапия, то есть иммуностимулирующий агент, который индуцирует или усиливает иммунный ответ. Такие агенты могут включать, например: 1) активаторы дендритных клеток, 2) адъюванты вакцин, 3) стимуляторы Т-клеток, 4) ингибиторы иммунологических контрольных точек, и 5) ингибиторы клеток-супрессоров, цитокинов и/или ферментов. Таким образом, в одном из вариантов осуществления антитело вводят с вакциной.

При клиническом применении терапевтически эффективное количество антитела, селективного к комплексу proTGFβ1-GARP, или антигенсвязывающего фрагмента вводят нуждающемуся в таком лечении субъекту. Например, антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, и их антигенсвязывающие фрагменты могут применяться для лечения раковых опухолей, которые содержат TGFβ1-положительные иммунные клетки. В предпочтительных вариантах осуществления антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP представляет собой описанное выше антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим, предпочтительно человеком. В некоторых вариантах осуществления антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или антигенсвязывающий фрагмент вводят в виде раствора, протестированного на стерильность.

Схемы дозировки при вышеописанных способах лечения и применения корректируют для обеспечения оптимального желательного ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно выполнить одно болюсное введение, ввести несколько разделенных доз в течение некоторого периода времени, либо дозу можно пропорционально уменьшить или увеличить по показаниям терапевтической ситуации. Парентеральные композиции могут готовить в виде стандартных единиц дозирования для упрощения введения и унификации дозирования.

Эффективные дозировки и схемы дозирования антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, и фрагментов зависят от подлежащего лечению заболевания или состояния и могут быть определены специалистом в данной области. Не имеющим ограничительного характера примером диапазона терапевтически эффективного количества соединения настоящего изобретения является диапазон около 0,001-10 мг/кг, например около 0,001-5 мг/кг, например около 0,001-2 мг/кг, например около 0,001-1 мг/кг, например около 0,001, около 0,01, около 0,1, около 1 или около 10 мг/кг.

Врач или ветеринар, являющийся специалистом в данной области, может легко определить и назначить необходимое эффективное количество фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать с более низких доз антитела, селективного к комплексу proTGFβ1-GARP, или фрагмента, входящих в фармацевтическую композицию, чем необходимо для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку до достижения желаемого эффекта. В целом приемлемой суточной дозой антитела, селективного к комплексу proTGFβ1-GARP, по настоящему изобретению будет такое количество соединения, которое является наименьшей дозой, вызывающей терапевтический эффект. Введение может быть, например, парентеральным, таким как внутривенное, внутримышечное или подкожное. В одном варианте осуществления антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или фрагмент можно вводить путем инфузии в еженедельной дозе, рассчитанной в мг/м². Такие дозы, например, можно рассчитать на основании доз в мг/кг, описанных выше, согласно следующей формуле: доза (мг/кг) × 70. Такое введение можно повторять, например, от 1 до 8 раз, например от 3 до 5 раз. Введение можно осуществлять путем непрерывной инфузии в течение периода времени от 2 до 24 ч, например от 2 до 12 ч. В одном варианте осуществления антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или фрагмент можно вводить путем медленной непрерывной инфузии в течение длительного времени, например более 24 ч, чтобы уменьшить побочные токсические эффекты.

В одном варианте осуществления антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или фрагмент можно вводить в еженедельной дозе, рассчитанной как фиксированная доза, вводимая до восьми раз, например от четырех до шести раз, один раз в неделю. Такую схему можно повторять один или более раз по мере необходимости, например, через шесть месяцев или двенадцать месяцев. Такие фиксированные дозы, например, могут быть основаны на вышеуказанных дозах в мг/кг в расчете на предполагаемую массу тела 70 кг. Дозу можно определять или корректировать, измеряя количество антитела, селективного к комплексу proTGFβ1-GARP, настоящего изобретения в крови после введения, например, путем получения биологической пробы и использования антиидиотипических антител, нацеленных на антигенсвязывающую область антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или фрагмент можно вводить в виде поддерживающей терапии, например один раз в неделю в течение периода в шесть или более месяцев.

Комплекс-селективное антитело proTGFβ1-GARP или фрагмент можно также вводить профилактически, чтобы снизить риск развития рака, замедлить начало развития событий при прогрессировании рака и/или снизить риск рецидива в случае ремиссии рака.

Антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, и их фрагменты, описанные в настоящем документе, также можно вводить в составе комбинированной терапии, т.е. в комбинации с другими терапевтическими агентами, релевантными для лечения заболевания или состояния. Соответственно, в одном варианте осуществления лекарственное средство, содержащее антитело, предназначено для комбинирования с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, такими как химиотерапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления другие терапевтические агенты без ограничений включают антинеопластические агенты, в том числе алкилирующие агенты, включая: азотистые иприты, например мехлоретамин, циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан и хлорамбуцил; нитрозомочевины, например, кармустин (BCNU), ломустин (CCNU) и семустин (метил-CCNU); Temodal™ (темозоламид), этиленимины/метилмеламин, например триэтиленмеламин (ТЕМ), триэтилен, тиофосфорамид (тиотепа), гексаметилмеламин (НММ, алтретамин); алкилсульфонаты, такие как бусульфат; триазины, например дакарбазин (DTIC); антиметаболиты, включая аналоги фолиевой кислоты, например метотрексат и триметотрексат, аналоги пиримидина, например 5-фторурацил (5FU), фтордеоксиуридин, гемцитабин, цитозинарабинозид (AraC, цитарабин), 5-азацитидин, 2,2'-дифтордеоксицитидин, пуриновые аналоги, например 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, азатиоприн, 2'-деоксикоформин (пентостатин), эритрогидроксинониладенин (ЕННА), флударабина фосфат и 2-хлордеоксиаденозин (кладрибин, 2-CdA); природные продукты, включая антимитотические препараты, например паклитаксел, алкалоиды барвинка, в том числе винбластин (VLB), винкристин и винорелбин, таксотер, эстрамустин и эстрамустина фосфат; пиподфил актиномицетоксины, например эпопозид и тенипозид; антибиотики, напримерин, D, дауномицин (рубидомицин), доксорубин, митоксантрон, идарубин, блеомицин, пликамицин (митрамицин), митомицин С и актиномицин; ферменты, например L-аспарагиназа; модуляторы биологического ответа, например интерферон-альфа, IL-2, G-CSF и GM-CSF; различные агенты, включая координационные комплексы платины, например цисплатин и карбоплатин, антраценодионы, например митоксантрон, замещенная мочевины, например, гидроксимочевина, производные метилгидразина, в том числе N-метилгидразин (МН) и прокарбазин, адренкортикостероидные супрессанты, например митотан (o,p-DDD) и аминоклутетимид; гормоны и антагонисты, в том числе адренкортикостероидные антагонисты, например преднизон и эквиваленты, дексаметазон и аминоклутетимид; Gemzar™ (гемцитабин), прогестин, например гидроксипрогестерона капроат, медроксипрогестерона ацетат и мегестрола ацетат; эстрогены, например диэтилстильбэстрол и эквиваленты этинилэстрадиола; антиэстрогены, например тамоксифен; андрогены, включая, тестостерона пропионат и флуоксиместерон/эквиваленты; антиандрогены, например флутамид, аналоги гонадотропин-высвобождающего гормона и лейпролид; и нестероидные антиандрогены, например флутамид. Методы терапии, мишенью которых является эпигенетический механизм, включая без ограничений ингибиторы гистондеацетилазы, деметилирующие агенты (например, Vidaza), и методы терапии с высвобождением факторов транскрипционной репрессии (АТРА) могут также комбинироваться с антителами, селективными к комплексу proTGFβ1-GARP.

К дополнительным конкретным примерам химиотерапевтических агентов относятся таксол, таксены (например, доцетаксел и таксотер), модифицированный паклитаксел (например, Abraxane и Oraphio), доксорубин, Avastin®, Sutent, Nexavar и другие мультикиназные ингибиторы, цисплатин и карбоплатин, эпопозид, гемцитабин и винбластин. Специфические ингибиторы других киназ также могут использоваться в комбинации с антителами, селективными к комплексу proTGFβ1-GARP, включая без ограничений ингибиторы пути MAPK (например, ингибиторы ERK, JNK и p38), ингибиторы PI3 киназы/АКТ и ингибиторы Pim. К другим ингибиторам относятся ингибиторы Hsp90, ингибиторы протеасом (например, Velcade) и ингибиторы различных механизмов действия, например Trisenox.

Такое комбинированное введение может быть одновременным, раздельным или последовательным, в любом порядке. При одновременном введении агенты можно вводить в виде одной композиции или в виде отдельных композиций, в зависимости от ситуации.

В одном варианте осуществления антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или его фрагмент объединяют со средством, стимулирующим антиген-презентирующие клетки. Примеры таких средств включают различные агонисты CD40, таких как агонист к антителу CD40L или CD40.

Некоторые способы включают в себя введение антитела, селективного к комплексу proTGFβ1-GARP, или его фрагмента с адьювантом вакцины. К таким адьювантам, например, относятся IL-12 и различные агонисты Tol-подобного рецептора (TLR), в том числе CpG (агонист TLR 9), монофосфорил липид А (MPL - агонист TLR4), PolyI:C или PolyI:CLC (агонист TLR3) и ресикимод и 852A (агонисты TLR 7/8).

В рамках других терапевтических подходов антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP вводят в комбинации с факторами роста Т-клеток, такими как IL-15 и/или IL-17, или с активаторами подобных молекул. В сходных способах стимулятор Т-клеток сочетается с антителом, селективным к комплексу proTGFβ1-GARP. К таким стимуляторам относятся агонисты 4-1BB, например агонист анти-4-1BB антител и 4-1BBL.

В одном варианте осуществления антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-

GARP или его фрагмент вводятся с ингибитором контрольных точек Т-клеток, например молекулами, которые посылают ингибирующий сигнал иммунной системе. К примерам таких агентов относятся ингибиторы PD-1 или PD-L1 (B7-H1), например анти-PD-1 антитела, в том числе ниволумаб (Bristol-Myers Squibb) и пембролизумаб, также известный как МК-3475 (Merck), пидилизумаб (Curetech), AMP-224 (Amplimmune) и анти-PD-L1 антитела, в том числе MPDL3280A (Roche), MDX-1105 (Bristol Myer Squibb), MEDI-4736 (AstraZeneca) и MSB-0010718C (Merck). К другим ингибиторам контрольных точек относятся антагонисты CTLA-4, например анти-CTLA-4 антитела. Примером анти-CTLA4 антитела является Yervoy® (ипилилумаб), предлагаемый Bristol-Myers Squibb. К другим примерам CTLA-4 антител относятся тремелизумаб (Pfizer), тисилизумаб (AstraZeneca) и AMGP-224 (Glaxo Smith Kline).

В других способах антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или его фрагмент вводятся в комбинации с ингибитором фермента, который обладает иммуносупрессивным действием. Примером является 1-метилтриптофан (1MT), который представляет собой малую молекулу-ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы.

Комплекс-селективное антитело proTGFβ1-GARP или его фрагмент могут также использоваться в комбинации с T-VEC (талимоген лагерпарепвек), разработанного Amgen.

В некоторых вариантах осуществления антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или его фрагмент вводятся в комбинации с биспецифическим антителом. Биспецифическое антитело может ориентировать иммунную систему хозяина, в частности, цитотоксическую активность Т-клеток, против раковых клеток.

Комплекс-селективное антитело proTGFβ1-GARP или его фрагмент могут также использоваться в комбинации с различными формами таргетной терапии. К примерам таргетной терапии без ограничений относится использование терапевтических антител. Примеры антител без ограничений включают антитела, связывающиеся с белками клеточной поверхности Her2, CDC20, CDC33, муциноподобным гликопротеином и рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), присутствующим на клетках опухоли, OX40, PD-1, CTLA-4, а также при необходимости индуцирующие цитостатическое и/или цитотоксическое воздействие на клетки опухоли, демонстрирующие такие белки. К примерам таких антител также относятся HERCEPTIN® (трастузумаб), который может использоваться для лечения рака молочной железы и других форм рака, и RITUXAN® (ритуксимаб), ZEVALIN™ (ибритумомаб триуксетан) и LYMPHOCIDE™ (эпратузумаб), которые могут использоваться для лечения неходжкинской лимфомы и других форм рака. Ряд других примеров антител также включает панитумумаб (VECTIBIX®), ERBITUX® (IMC-C225); BEXXAR™ (йод-131-тоситумомаб); ингибиторы KDR (рецептор киназного домена); анти-VEGF антитела и антагонисты (например, Avastin® и VEGAF-TRAP); антитела к VEGF рецептору и антигенсвязывающие области; анти-Ang-1 и -Ang-2 антитела и антигенсвязывающие области; антитела к Tie-2 и другим рецепторам Ang-1 и Ang-2; лиганды Tie-2; антитела к ингибиторам киназы Tie-2; ингибиторы Hif-1a и Campath™ (алемтузумаб). В некоторых вариантах осуществления агентами противораковой терапии являются полипептиды, которые селективно индуцируют апоптоз в клетках опухоли, в том числе без ограничений TNF-связанный полипептид TRAIL.

В одном варианте осуществления антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или его фрагмент, как описано в настоящем документе, используется в комбинации с одним или более антиангиогенных агентов, которые уменьшают ангиогенез. К некоторым таким агентам без ограничений относятся антагонисты IL-8; Campath, B-FGF; антагонисты FGF; антагонисты Tek (Cerretti et al., U.S. Publication No. 2003/0162712; Cerretti et al., U.S. Pat. No. 6,413,932, и Cerretti et al., U.S. Pat. No. 6,521,424); агенты анти-TWEAK (к которым без ограничений относятся антитела и антигенсвязывающие области); растворимые антагонисты рецептора TWEAK (Wiley, U.S. Pat. No. 6,727,225); домен дезинтегрин ADAM в качестве антагониста связывания интегрин с его лигандами (Fanslow et al., U.S. Publication No. 2002/0042368); анти-эфрин рецептор и анти-эфрин антитела; антигенсвязывающие области или антагонисты (U.S. Pat. Nos. 5,981,245; 5,728,813; 5,969,110; 6,596,852; 6,232,447; 6,057,124); анти-VEGF агенты (например, антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связывают VEGF, или растворимые рецепторы VEGF, или их связывающие лиганд области), например Avastin® или VEGF-TRAP™, и агенты анти-VEGF рецептора (например, антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связываются с ними), ингибирующие EGFR агенты (например, антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связываются с ними), например панитумумаб, IR-ESSA™ (гефитиниб), TARCEVA™ (эрлотиниб), анти-Ang-1 и анти-Ang-2 агенты (например, антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связываются с ними или их рецепторами, например, Tie-2/ТЕК), и ингибирующие агенты анти-Tie-2 киназы (например, антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связываются и ингибируют активность факторов роста, например антагонисты фактора роста гепатоцитов (HGF, также известного, как рассеивающий фактор), и антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связывают его рецептор "c-met" (например, рилотумумаб и AMG 337, Amgen); антагонисты к PDGF-BB; антитела и антигенсвязывающие области к лигандам PDGF-BB; и ингибиторы киназы PDGFR.

К другим антиангиогенным агентам, которые могут применяться в комбинации с антителами, се-

лективными к комплексу proTGF β 1-GARP, или его фрагментом, относятся такие агенты, как ингибиторы MMP-2 (матричная металлопротеиназа 2), ингибиторы MMP-9 (матричная металлопротеиназа 9) и ингибиторы COX-II (циклооксигеназа II). Примеры подходящих ингибиторов COX-II включают CELEBREX™ (целекоксиб), валдекоксиб и рофекоксиб.

Комплекс-селективное антитело proTGF β 1-GARP или его фрагмент, как описано, можно также применять в комбинации с ингибитором фактора роста. К примерам таких агентов без ограничений относятся агенты, которые могут ингибировать ответ EGF-R (рецептор эпидермального фактора роста), например антитела EGF-R (например, панитумумаб (VECTIBIX®)), антитела EGF и молекулы, которые являются ингибиторами EGF-R; ингибиторы VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), например рецепторы VEGF и молекулы, которые в состоянии ингибировать VEGF; и ингибиторы рецепторов erbB2, например органические молекулы или антитела, которые связываются с рецептором erbB2, например HERCEPTIN® (Genentech, Inc.). Ингибиторы EGF-R, которые описаны, например, в патенте США № 5,747,498, WO 98/14451, WO 95/19970 и WO 98/02434.

В некоторых терапевтических приложениях, в частности, при метастазировании рака в кости с негативным воздействием на кость, может быть целесообразно вводить антитело, селективное к комплексу proTGF β 1-GARP, proTGF β 1-GARP или его фрагмент с терапевтическим агентом, который препятствует дальнейшей потере костной массы или способствует восстановлению потерянной костной массы. Соответственно, антитело, селективное к комплексу proTGF β 1-GARP, proTGF β 1-GARP или его фрагмент могут вводиться вместе с терапевтически эффективным количеством агента, способствующего росту костной массы (анаболик), или агентом, препятствующим резорбции кости, в том числе без ограничений: костные морфогенетические факторы с обозначениями от BMP-1 до BMP-12; трансформирующий фактор роста- β и входящие в семейство TGF- β ; факторы роста фибробластов от FGF-1 до FGF-10; ингибиторы интерлейкина-1 (в том числе IL-1 α , антитела к IL-1 и антитела к рецепторам IL-1); ингибиторы TNF α (в том числе этанерцепт, адалимумаб и инфликсимаб); ингибиторы лиганда RANK (включая растворимый RANK, остеопротегерин и антагонистические антитела, которые специфически связывают RANK или лиганд RANK, например, деносумаб (XGEVA®)), ингибиторы Dkk-1 (например, антитела к Dkk-1), паращитовидный гормон, простагландины группы E, бифосфонаты и упрочняющие костную ткань минеральные вещества, например, фтор и кальций. К анаболическим агентам, которые могут использоваться в комбинации с антителами, селективными к комплексу proTGF β 1-GARP, и их функциональными фрагментами, относятся паращитовидный гормон и инсулиноподобный фактор роста (IGF), при этом последний агент предпочтительно применяется в комплексе с IGF-связывающим белком. Антагонист рецептора IL-1, пригодный для такой комбинированной терапии, описан в WO89/11540, и пригодный растворимый TNF рецептор-1 описан в WO98/01555. Примеры антагонистов лиганда RANK раскрываются, например, в WO 03/086289, WO 03/002713, патентах США № 6,740,511 и 6,479,635.

В одном варианте осуществления предлагаемый способ лечения рака включает введение нуждающемуся в таком лечении субъекту терапевтически эффективного количества антитела, селективного к комплексу proTGF β 1-GARP, как описано в настоящем документе, в сочетании с радиационной терапией. Лучевая терапия может включать облучение или соответствующее введение радиофармацевтических препаратов пациенту. Источник излучения может быть внешним или внутренним по отношению к получающему лечению пациенту (лучевая терапия может, например, представлять собой дистанционную лучевую терапию (EBRT) или брахитерапию (BT)). Радиоактивные элементы, которые можно использовать на практике для этих способов, включают в себя, например, радий, цезий-137, иридий-192, америций-241, золото-198, кобальт-57, медь-67, технеций-99, йод-123, йод-131 и индий-111.

Способы обнаружение комплекса proTGF β 1 GARP.

В настоящем документе предлагаются способы обнаружения комплекса proTGF β 1 в биологическом образце путем приведения образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанным в настоящем документе. Как описано в настоящем документе, пробу можно получать из мочи, крови, сыворотки, плазмы, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т.е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т.п. В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают в себя обнаружение комплекса proTGF β 1-GARP в биологическом образце путем приведения образца в контакт с любым из антител, селективных к комплексу proTGF β 1-GARP, или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления образец можно привести в контакт с более чем одним из антител, селективных к комплексу proTGF β 1-GARP, или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Например, образец можно привести в контакт с первым антителом, селективным к комплексу proTGF β 1-GARP, или его антигенсвязывающим фрагментом, а затем привести в контакт со вторым антителом, селективным к комплексу proTGF β 1-GARP, или его антигенсвязывающим фрагментом, причем первое антитело или антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или антигенсвязывающий

вающий фрагмент не являются одним и тем же антителом или антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления перед приведением в контакт с пробой первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть прикреплено к поверхности, например поверхности многолуночного планшета, чипа, либо к сходному субстрату. В других вариантах осуществления перед приведением в контакт с пробой первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть ни к чему не прикреплены или не зафиксированы.

Описанные антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, и антигенсвязывающие фрагменты могут быть помечены с возможностью обнаружения. В некоторых вариантах осуществления меченые антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут облегчать обнаружение комплекса proTGFβ1-GARP посредством способов, описанных в настоящем документе. Специалисту в данной области хорошо известны многие подобные метки. Например, приемлемые метки включают в себя, без ограничений, радиоактивные метки, флуоресцентные метки, эпитопные метки, биотин, хромофорные метки, ECL-метки или ферменты. Более конкретно, описанные метки включают в себя рутений, ¹¹¹In-DOTA, ¹¹¹In-диэтиленetriаминпентауксусную кислоту (DTPA), пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и бета-галактозидазу, полигистидин (HIS-метку), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители, красители Alexa Fluor® и т.п.

Описанные антитела, селективные к комплексу proTGFβ1-GARP, и антигенсвязывающие фрагменты можно использовать в разных анализах для обнаружения proTGFβ1 в биологическом образце. Некоторые приемлемые анализы включают без ограничений вестерн-блот, радиоиммунологический анализ, метод поверхностного плазмонного резонанса, иммунофлуориметрию, иммунопреципитацию, равновесный диализ, иммунодиффузию, электрохемилюминесцентный (ECL) иммунологический анализ, иммуногистохимию, цитометрию посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или твердофазный ИФА.

Наборы для обнаружения комплекса proTGFβ1-GARP.

В настоящем документе предлагаются наборы для обнаружения комплекса proTGFβ1 в биологическом образце. Эти наборы включают в себя одно или более антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, описанных в настоящем документе, или их антигенсвязывающих фрагментов и инструкции по применению набора.

Предлагаемое антитело, селективное к комплексу proTGFβ1-GARP, proTGFβ1-GARP или антигенсвязывающий фрагмент может находиться в растворе; быть лиофилизированными; прикрепленными к субстрату, носителю или планшету; или могут быть мечеными с возможностью обнаружения.

Описанные наборы также могут включать в себя дополнительные компоненты, используемые для осуществления способов, описанных в настоящем документе. В качестве примера наборы могут содержать средства для получения пробы от субъекта, контрольной или эталонной пробы, например пробы от субъекта с медленно прогрессирующим раком и/или субъекта без рака, одно или более отделений для проб и/или материалы инструкций, в которых описано осуществление способов изобретения, и тканеспецифические контроли или стандарты.

Средства для определения уровня комплекса proTGFβ1-GARP могут дополнительно включать, например, буферы и другие реагенты, предназначенные для применения в анализе для определения уровня комплекса proTGFβ1-GARP. Инструкции могут представлять собой, например, печатные инструкции по выполнению анализа и/или инструкции по оценке уровня экспрессии комплекса proTGFβ1-GARP.

Описанные наборы также могут включать в себя средства для выделения пробы от субъекта. Эти средства могут содержать один или более элементов оборудования или реагентов, которые можно использовать для получения текучей среды или ткани от субъекта. Средства для получения пробы от субъекта также могут представлять собой средства для выделения компонентов крови, таких как сыворотка, из пробы крови. Предпочтительно набор предназначен для применения у человеческого индивида.

Примеры

Представленные ниже примеры приводятся в качестве дополнения к приведенному выше описанию и в целях лучшего понимания объекта изобретения, описанного в настоящем документе. Эти примеры не следует считать ограничивающими описанный объект изобретения. Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, предназначены только для иллюстративных целей, и в свете этого специалистам в данной области будут очевидны различные модификации и изменения, которые следует включать в объем изобретения и которые можно вносить без выхода за рамки объема изобретения.

Пример 1: обнаружение антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, с использованием технологии фагового дисплея.

Операции по разработке антител были предприняты для разработки антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP. В качестве источника фрагментов человеческих антител использовалась запатентованная полностью интактная библиотека фагового дисплея ChemPartner (Chempartner, Шанхай, Китай). Сначала библиотеку подвергали негативному панорамированию против комбинированной смеси

биотинилированного sGARP (SEQ ID NO: 1) и LTBP1-proTGFβ1 (SEQ ID NO: 2 и 3) для удаления фрагментов scFv, которые связывают нежелательный комплекс LTBP1-proTGFβ1 или некомплексированный белок sGARP. Выход невыбранной библиотеки затем подвергали панорамированию против sGARP-proTGFβ1 в течение нескольких раундов. Двадцать пять scFv, которые специфически связывались с sGARP-proTGFβ1, были отобраны на основе уникальных последовательностей HCDR3, желаемой комплексной селективности и лабильности последовательности. Уникальные V-области тяжелой цепи клонировали в векторы экспрессии человеческого IgG4, уникальные легкие цепи клонировали в человеческие векторы экспрессии каппа и полученные кандидаты антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, тестировали на предмет активности связывания в ELISA. Для дальнейшей характеристики отбирали наиболее прочно связывающиеся соединения.

Пример 2: ингибирование функции Treg посредством 4B1c1 и 4b16b9 in vitro.

Кандидаты комплексно-селективных антител к proTGFβ1-GARP, полученные в предыдущем примере, тестировали в отношении ингибирования функции Treg человека в анализе подавления in vitro. Активированные CD4⁺ CD25^{hi}-супрессорные клетки применяли в качестве источника Tregs, а меченные CFSE CD4⁺ CD25-эффекторные Т-клетки (клетки Teff) применяли в качестве мишеней для подавления пролиферации. Клетки инкубировали в соотношении 1 Treg/1 Teff с связанным с планшетами анти-CD3, растворимым анти-CD28 и в присутствии или в отсутствие кандидатов на антитела к комплексно-селективному комплексу proTGFβ1-GARP. Tregs ингибировали пролиферацию клеток Teff на ~50% по сравнению только с Т-эффекторами. Уровни пролиферации Teff (инкубированные с Treg) были восстановлены в присутствии 4B1C1 и частично восстановлены с помощью 4B16B9 по сравнению с контрольной группой Treg/Teff или hIgG4 (фиг. 1). Данные результаты подтверждают активность TGF-β1 в иммуносупрессии Treg человека и указывают на то, что 4B1C1 и 4B16B9 могут частично блокировать эту активность in vitro, аналогично нейтрализующему положительному контролю антителу TGFβ 1D11 (номер по каталогу R & D Systems MAB-1835).

Таблица 2

Последовательности CDR двух кандидатов антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, которые показали связывание с комплексом proTGFβ1-GARP и ингибирование функции Treg человека in vitro (SEQ ID NO:)

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
4B1C1	DYTMH (4)	LISWDGGSTYYADSVK G (5)	DADDSTFDI (6)	RASQSVSRNLA (7)	WASTRES (8)	QQYYSVPYT (9)
4B16B 9	SYAIS (10)	GII PMFGTTNYAQKFQ G (11)	DREWEPAVGMDV (12)	IGTSSDVGGYNY VS (13)	DVSNRPS (14)	SAYTVSSTWV (15)

Области VH и VL для двух кандидатов антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, моноклональных антител к proTGFβ1 показаны ниже в табл. 3.

Таблица 3

Последовательности тяжелой и легкой цепи двух кандидатов антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, которые показали связывание с комплексом proTGFβ1-GARP и ингибирование функции Treg человека in vitro. Варибельные области подчеркнуты

Идентификатор mAb	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность легкой цепи	SEQ ID NO:
4B1C1	<u>EVQLVQSGG</u> <u>VVQPGGSLRL</u> <u>SCAASGFTFDDYTMHWVRQAPGKGLEWVSLISWDGGSTYYADSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNSLYLQMN</u> <u>SLRTEDTALYYCAK</u> <u>DADDSTFDI</u> <u>WGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS</u>	16	<u>ETTLTQSPATLSVSPGERVTL</u> <u>SCRASQSVSRNLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS</u> <u>SLSLAEDVA</u> <u>VAYYCQQYYSV</u> <u>PYTFGQGTKLEIK</u> <u>RTVAAPS</u> <u>VFI</u> <u>FPPLSDEQLKSGTASV</u> <u>VCLLNNFYP</u> <u>PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ</u> <u>DSK</u> <u>DSTY</u> <u>SL</u> <u>STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN</u>	17

	GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVFPSSSLGKTYTCNV SNTKVDKRVESKYGPPCP EFLGGPSVFLFPPKPKD TPEVTCVVVDVSQEDPEV VDGVEVHNAKTKPREEQF VVSVLTVLHQDWLNGKEY NKGLPSSIEKTIKAKGQ VYTLPPSQEEMTKNQVSL GFYPSDIAVEWESNGQP TPPVLDSDGSFFLYSRL WQEGNVFSCSVMHEALHN SLSLSLG		RGEC	
4B16B9	QMQLVQSGAEVKKPGSSV ASGGTFSSYAISWVRQAP WMGGIIPMFGTTNYAQKF IIADESTSTAYMELRSLR VYYCARDREWEFPAYGMD TVTSSASTKGPSVFPPLA TSESTAALGCLVKDYFPE WNSGALTSGVHTFPAVLQ SLSSVTVFPSSSLGKTYTC HKPSNTKVDKRVESKYGPP PAPEFLGGPSVFLFPPKPK ISRTPEVTCVVVDVSQED NWYVDGVEVHNAKTKPRE TYRVVSVLTVLHQDWLNG KVS NKGLPSSIEKTIKAK EPQVYTLPPSQEEMTKNQ LVKGFYPSDIAVEWESNG YKTTPPVLDSDGSFFLYS KSRWQEGNVFSCSVMHE TQKSLSLSLG	18	QSALTQPASVSGSPGQSI GYNYSWYQOHPGKAPKLM SNRFGSKSGNTASLTISGL SAYTVSSTWVFGGKVTVL LFPPSSEELQANKATLVCL AWKADSSPVKAGVETTT YLSLTPQWKSHRYSQC APTECS	19

Пример 3: биоанализ TGFβ1.

Способность кандидатов-комплексно-селективных антител к proTGFβ1-GARP регулировать уровни активного TGFβ1 измеряли с использованием репортерных клеток TMLC с интегрированной единицей экспрессии люциферазы, чувствительной к TGFβ/Smad3. Вкратце, клетки HEK293 или Sw480 временно трансфицировали либо человеческими proTGFβ1 и LTBP1, либо человеческими плазмидами экспрессии proTGFβ1 и GARP. Клеткам давали возможность восстановиться после трансфекции и экспрессировать proTGFβ1 в комплексе с LTBP1 или GARP в течение 24 ч при 37°C, после чего можно было провести анализ. Для проведения анализа временные трансфектанты совместно культивировали с клетками SW480β6, которые стабильно экспрессируют TGFβ1-активирующий интегрин αVβ6.

Для подтверждения того, что анализ работал, как предполагалось, образцы сред с известными концентрациями фактора роста TGF-β1 добавляли к культурам репортерных клеток TMLC для получения стандартной кривой.

Кандидаты антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, к ProTGFβ1-GARP (10 мкг/мл) объединяли с трансфицированными клетками и добавляли в культуры репортерных клеток TMLC. Затем чашки инкубировали при 37°C в течение 16 ч. Ожидается, что успешная передача сигналов TGFβ1 активирует путь SMAD2/3, за которым следует экспрессия люциферазы, которую можно обнаружить, добавив Bright-Glo, как указано производителем (Promega), и измеряя полученную люминесценцию в ридере Biotek Synergy H1 (Biotek).

Антитела 4B1C1 и 4B16B9 индуцировали значительно сниженную экспрессию люциферазы по сравнению с лечением в контрольной группе, что указывает на то, что эти антитела регулируют уровни активного фактора роста TGFβ1 и снижают опосредованную TGFβ1 передачу сигналов в клетках. Данный эффект аналогичен действию положительного контроля нейтрализующего антитела против TGFP 1D11.

Пример 4: измерение аффинности посредством интерферометрии бислоя.

Аффинность связывания кандидатов антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, являющихся кандидатами в комплексы proTGFβ1-GARP, измеряли с помощью биослойной интерферометрии на OctetRed 384 (Fortebio, Menlo Park, CA). Биосенсоры стрептавидина (Fortebio, Cat. № 18-5020) загружали с биотинилированным комплексом sGARP-proTGFβ1 в концентрации 20 мкг/мл в натрий-ацетатном буфере, pH 5, промывали в том же буфере и переносили в лунки, содержащие 10 мкг/мл кандидатов антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, в тот же буфер. Константу диссоциации получали путем нелинейной подгонки откликов к алгоритму установившегося состояния с использова-

нием программного обеспечения Octet (табл. 4). Подобные средства были получены путем кинетической подгонки.

Таблица 4

Результаты аффинности октетов для кандидатов антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, связываются с комплексом proTGFβ1-GARP человека

mAb	Комплекс proTGFβ1 GARP	K_D (нМ)
4B1C1	Человеческая	0,114 +/- 0,004
4B16B9	Человеческая	0,880 +/- 0,036

Чтобы установить специфичность связывания, 4B1C1 и 4B16B9 подвергали скринингу, как указано выше, для связывания с TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3, proTGFβ1-LTBP1, proTGFβ1-LTBP3 и proTGFβ1-LRRC33. Как описано выше, антитела тестировали в концентрации 10 дг/мл, а антигены - в концентрации 20 дг/мл и тестировали в следующих условиях. Эти исследования продемонстрировали отсутствие заметного связывания антител с любым антигеном, кроме комплекса proTGFβ1-GARP, и показано на фиг. 4.

Таблица 5

Условия анализа для определения специфичности связывания антител

Номер стадии анализа	Тип стадии	Время анализа в секундах
1	Исходный уровень	60
2	Загрузка антигена	180
3	Исходный уровень	60
4	Связь	300
5	Диссоциация	600

Пример 5: анализ дозозависимого эффекта.

Концентрационная зависимость регуляции посредством кандидата антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, уровней активного TGFβ1, была измерена с использованием репортерных клеток TMLC с интегрированной TGFβ/Smad3-чувствительной единицей экспрессии люциферазы, как описано в ПРИМЕРЕ 3, с единственным отличием в том, что кандидаты антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, добавляли в экспериментальные лунки в различных концентрациях, продемонстрировано, что 4B1C1 4B16B9 может ингибировать TGFβ1 и активировать в зависимости от дозы от 0,178 нМ с IC50 и 1,9 нМ соответственно (фиг. 3).

Пример 6: характеристика антитела.

Кандидаты антител, селективных к комплексу proTGFβ1-GARP, измеряли биослойной интерферометрией на приборе OctetRed 384 (Fortebio, Menlo Park, CA) для определения селективности в отношении комплекса proTGFβ1-GARP по сравнению с другими белковыми комплексами (фиг. 4). 4B1C1 и 4B16B9 демонстрировали константу диссоциации (K_d) менее 1 нМ для комплекса proTGFβ1-GARP, в то время как не обнаруживали детектируемого связывания с комплексами proTGFβ1-LTBP1 или proTGFβ1-LTBP3. 4B1C1 и 4B16B9 также не проявляли связывания с факторами роста TGFβ1, TGFβ2 или TGFβ3.

Связывание антител с комплексами proTGFβ1-LRRC33 также тестировали. Комплекс proTGFβ1-LRRC33 экспрессировали и очищали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC), а образование неагрегированных комплексов подтверждали аналитическим SEC. Связывание 4B1C1 и 4B16B9 с очищенным комплексом proTGFβ1-LRRC33 затем тестировали с помощью анализа OctetRed 384 (Fortebio, Menlo Park, CA), как описано в примере 4. Для этого 4B1C1 или 4B16B9 захватывали на кончиках Fc против человека, и Октет обнаруживал связывание либо proTGFβ1-GARP, либо proTGFβ1-LRRC33. В отличие от proTGFβ1-GARP, связывания 4B1C1 или 4B16B9 с комплексом proTGFβ1-LRRC33 обнаружено не было.

Краткое описание списка последовательностей.

SEQ ID NO:	Тип	Вид	Описание	Последовательность
1	PRT	Человеческая	sGARP	HQDKVPCRMVDKKVSCQVLGGLQVPSVLPDTEITLDDL SGNQLRSILASPLGFYTAIRHLLDLSTNEISFLQ PGAFQALTHLEHLSLAHNRLAMATALSAGGLGPLPRV TSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAEN SLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSNVIMDIEDGAFEGGL PRLTHLNLSRNSLTCTISDFSLQQLRVLDLSCNS IEAFQTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPR LIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSA LPLSAPSGNASGRPLSQLNLDLSYNEIELIPDSFLE HLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLMLLD LSHNALETLELGARALGSLRLLLLQGNALRDLPPYTF ANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPEPFGPSGCVAF SGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFHLHTPLTELDLSSN PGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVLQVD LPCFICLKRLNLAENRISHLPAWTQAVSLEVLDLRNN SFSLLPGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNG WLAQLHQGRVDVDTQDLICRFSSQEEVSLSHVRPE DCEKGGGLKNINHHHHHH
2	PRT	Человеческая	proTGFβ1	LSTCKTIDMELVKKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEP EADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFEN TSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHQHVE LYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQ

				WLSRGGIEEGFRLSAHCSCDSDRDNTLQVDINGF TTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRH RRALDTNYCFSSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWK WIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQH NPGASAAPCCVPQALEPLPIVYVYVGRKPKVEQL SNMIVRSCKCS
3	PRT	Человеческая	Фрагмент LTBP1	EINECTVNPDI CGAGHCINLPVRYTCICYEGYRFSEQ QRKCVDI DECTQVQHLCSQGRCENTEGSFLCIC PAGFMASEEGTNCIDVDECLRPDVCGEHCVNTVGAF RCEYCDSGYRMTQRGRCEIDIDECLNPSTCPDEQ CVNSPESYQCVPCTEGFRGWNGQCLDVECLEPNVCA NGDCSNLEGSYMCSSCHKGYTRTPDHKHCARDIDE CQQGNLVCVNGQCKNTEGSFRCTCGQYQLSAAKDQCE DIDECQHRHLCAHGQCRNTEGSFQCVCDQGYRA SGLGDHCEIDINECLEDEKSVQQRGDCINTAGSYDCTCP DGFQLDNDKTCQDINECEHPGLCGPQGECLNTE GSFHCVCQQGFSISADGRCTEDI DECVNNTVCDSHGF CDNTAGSFRCLCYQGQAPQDQGGQCVDVNECEL LSGVCGEAFENVEGSFLVCADENQEYSFMTGQCRS RTSTDLDVDVDQPKKEKKECYYNLNDASLCDNV LAPNVTKECCCTSGVGVGDNCEIFPCVPLGTAEFTE MCPKKGKGFVPAGESSEAGGENYKDADECLLFG QEICKNGFCLNTRPGYECYCKQGTYYDPVKLQCFDMD ECQDPSSCIDGQCVNTEGSYNCFCTHPMVLDS EKRCIHNNHHH
4	PRT	Человеческая	4B1C1-HCDR1	DYTMH
5	PRT	Человеческая	4B1C1-HCDR2	LISWDGGSTYYADSVKG
6	PRT	Человеческая	4B1C1-HCDR3	DADDSTFDI
7	PRT	Человеческая	4B1C1-LCDR1	RASQSVSRNLA
8	PRT	Человеческая	4B1C1-LCDR2	WASTRES
9	PRT	Человеческая	4B1C1-LCDR3	QQYYSVPYT
10	PRT	Человеческая	4B16B9-HCDR1	SYAIS
11	PRT	Человеческая	4B16B9-HCDR2	GIIPMFGTNYAQKFQG
12	PRT	Человеческая	4B16B9-HCDR3	DREWEPAYGMDV
13	PRT	Человеческая	4B16B9-LCDR1	IGTSSDVGGINYVS
14	PRT	Человеческая	4B16B9-LCDR2	DVSNRPS
15	PRT	Человеческая	4B16B9-LCDR3	SAYTVSSTWV
16	PRT	Человеческая	Тяжелая цепь 4B1C1	EVQLVQSGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYTMHWV RQAPGKGLEWVSLISWDGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNSLYLQMNLSLRTEDTALYYCARDADDSTFDIWGG TMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
17	PRT	Человеческая	4B1C1 - легкая цепь	ETTLTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSVSRNLAWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSDFTLT ISSLQAEADVAVYQQYYYSVPYTFGGTKLEIKRTVA APSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	PRT	Человеческая	Тяжелая цепь 4B16B9	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGGTFSSYAI SWV RQAPGQGLEWMMGGIIPMFGTNYAQKFQGRVTIIADE STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDREWEPAYGMDVW GGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK
				YGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL SLC
19	PRT	Человеческая	Легкая цепь 4b16B9	QSALTQPASVSGSPGQSITISCI GTSSDVGGINYVSW YQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTAS LTI SGLQAEDEAMYCSAYTVSSTWVFGGKTVTVLG QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYYAASSYLSLT PEQWKSRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Перечень последовательностей

<110> СКОЛАР РОК, ИНК.
 КАРВЕН, ГРЕГОРИ ДЖ.
 ШУРПФ, ТОМАС
 ТЕРНЕР, КЭТРИН

<120> АНТИТЕЛА К TGF-БЕТА, СПОСОБЫ И ПРИМЕНЕНИЯ

<130> JVI5093WOPST

<140> ПЕРЕУСТУПКА ПРАВ
 <141> 14.07.2017

<150> 62/371,355
 <151> 2016-08-05

<150> 62/362,393
 <151> 2016-07-14

<160> 19

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1
 <211> 614
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 His Gln Asp Lys Val Pro Cys Lys Met Val Asp Lys Lys Val Ser Cys
 1 5 10 15
 Gln Val Leu Gly Leu Leu Gln Val Pro Ser Val Leu Pro Pro Asp Thr
 20 25 30
 Glu Thr Leu Asp Leu Ser Gly Asn Gln Leu Arg Ser Ile Leu Ala Ser
 35 40 45
 Pro Leu Gly Phe Tyr Thr Ala Leu Arg His Leu Asp Leu Ser Thr Asn
 50 55 60
 Glu Ile Ser Phe Leu Gln Pro Gly Ala Phe Gln Ala Leu Thr His Leu
 65 70 75 80
 Glu His Leu Ser Leu Ala His Asn Arg Leu Ala Met Ala Thr Ala Leu
 85 90 95
 Ser Ala Gly Gly Leu Gly Pro Leu Pro Arg Val Thr Ser Leu Asp Leu
 100 105 110
 Ser Gly Asn Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Leu Glu Arg Leu Leu Gly Glu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Leu His Thr Leu Ser Leu Ala Glu Asn Ser Leu Thr Arg

046204

Tyr Thr Phe Ala Asn Leu Ala Ser Leu Gln Arg Leu Asn Leu Gln Gly
385 390 395 400

Asn Arg Val Ser Pro Cys Gly Gly Pro Asp Glu Pro Gly Pro Ser Gly
405 410 415

Cys Val Ala Phe Ser Gly Ile Thr Ser Leu Arg Ser Leu Ser Leu Val
420 425 430

Asp Asn Glu Ile Glu Leu Leu Arg Ala Gly Ala Phe Leu His Thr Pro
435 440 445

Leu Thr Glu Leu Asp Leu Ser Ser Asn Pro Gly Leu Glu Val Ala Thr
450 455 460

Gly Ala Leu Gly Gly Leu Glu Ala Ser Leu Glu Val Leu Ala Leu Gln
465 470 475 480

Gly Asn Gly Leu Met Val Leu Gln Val Asp Leu Pro Cys Phe Ile Cys
485 490 495

Leu Lys Arg Leu Asn Leu Ala Glu Asn Arg Leu Ser His Leu Pro Ala
500 505 510

Trp Thr Gln Ala Val Ser Leu Glu Val Leu Asp Leu Arg Asn Asn Ser
515 520 525

Phe Ser Leu Leu Pro Gly Ser Ala Met Gly Gly Leu Glu Thr Ser Leu
530 535 540

Arg Arg Leu Tyr Leu Gln Gly Asn Pro Leu Ser Cys Cys Gly Asn Gly
545 550 555 560

Trp Leu Ala Ala Gln Leu His Gln Gly Arg Val Asp Val Asp Ala Thr
565 570 575

Gln Asp Leu Ile Cys Arg Phe Ser Ser Gln Glu Glu Val Ser Leu Ser
580 585 590

His Val Arg Pro Glu Asp Cys Glu Lys Gly Gly Leu Lys Asn Ile Asn
595 600 605

His His His His His His
610

<210> 2

<211> 361

<212> Белок

046204

<213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Ser Thr Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg
 1 5 10 15

Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser
 20 25 30

Pro Pro Ser Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val
 35 40 45

Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala
 50 55 60

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr
 65 70 75 80

Arg Val Leu Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys
 85 90 95

Gln Ser Thr His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg
 100 105 110

Glu Ala Val Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu
 115 120 125

Leu Arg Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys
 130 135 140

Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro
 145 150 155 160

Ser Asp Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg
 165 170 175

Gln Trp Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala
 180 185 190

His Cys Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn
 195 200 205

Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met
 210 215 220

Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln
 225 230 235 240

046204

His Leu Gln Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys
245 250 255

Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp
260 265 270

Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr
275 280 285

His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp
290 295 300

Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly
305 310 315 320

Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro
325 330 335

Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn
340 345 350

Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
355 360

<210> 3

<211> 640

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Ile Asn Glu Cys Thr Val Asn Pro Asp Ile Cys Gly Ala Gly His
1 5 10 15

Cys Ile Asn Leu Pro Val Arg Tyr Thr Cys Ile Cys Tyr Glu Gly Tyr
20 25 30

Arg Phe Ser Glu Gln Gln Arg Lys Cys Val Asp Ile Asp Glu Cys Thr
35 40 45

Gln Val Gln His Leu Cys Ser Gln Gly Arg Cys Glu Asn Thr Glu Gly
50 55 60

Ser Phe Leu Cys Ile Cys Pro Ala Gly Phe Met Ala Ser Glu Glu Gly
65 70 75 80

Thr Asn Cys Ile Asp Val Asp Glu Cys Leu Arg Pro Asp Val Cys Gly
85 90 95

Glu Gly His Cys Val Asn Thr Val Gly Ala Phe Arg Cys Glu Tyr Cys

046204

	100		105		110														
Asp	Ser	Gly	Tyr	Arg	Met	Thr	Gln	Arg	Gly	Arg	Cys	Glu	Asp	Ile	Asp				
		115					120					125							
Glu	Cys	Leu	Asn	Pro	Ser	Thr	Cys	Pro	Asp	Glu	Gln	Cys	Val	Asn	Ser				
	130					135					140								
Pro	Gly	Ser	Tyr	Gln	Cys	Val	Pro	Cys	Thr	Glu	Gly	Phe	Arg	Gly	Trp				
145					150					155					160				
Asn	Gly	Gln	Cys	Leu	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Leu	Glu	Pro	Asn	Val	Cys				
				165					170					175					
Ala	Asn	Gly	Asp	Cys	Ser	Asn	Leu	Glu	Gly	Ser	Tyr	Met	Cys	Ser	Cys				
			180					185					190						
His	Lys	Gly	Tyr	Thr	Arg	Thr	Pro	Asp	His	Lys	His	Cys	Arg	Asp	Ile				
		195					200					205							
Asp	Glu	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Leu	Cys	Val	Asn	Gly	Gln	Cys	Lys	Asn				
	210					215					220								
Thr	Glu	Gly	Ser	Phe	Arg	Cys	Thr	Cys	Gly	Gln	Gly	Tyr	Gln	Leu	Ser				
225					230					235					240				
Ala	Ala	Lys	Asp	Gln	Cys	Glu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Gln	His	Arg	His				
				245					250					255					
Leu	Cys	Ala	His	Gly	Gln	Cys	Arg	Asn	Thr	Glu	Gly	Ser	Phe	Gln	Cys				
			260					265					270						
Val	Cys	Asp	Gln	Gly	Tyr	Arg	Ala	Ser	Gly	Leu	Gly	Asp	His	Cys	Glu				
		275					280					285							
Asp	Ile	Asn	Glu	Cys	Leu	Glu	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Gln	Arg	Gly	Asp				
	290					295					300								
Cys	Ile	Asn	Thr	Ala	Gly	Ser	Tyr	Asp	Cys	Thr	Cys	Pro	Asp	Gly	Phe				
305					310					315					320				
Gln	Leu	Asp	Asp	Asn	Lys	Thr	Cys	Gln	Asp	Ile	Asn	Glu	Cys	Glu	His				
				325					330					335					
Pro	Gly	Leu	Cys	Gly	Pro	Gln	Gly	Glu	Cys	Leu	Asn	Thr	Glu	Gly	Ser				
			340					345					350						

046204

Phe His Cys Val Cys Gln Gln Gly Phe Ser Ile Ser Ala Asp Gly Arg
 355 360 365

Thr Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Val Asn Asn Thr Val Cys Asp Ser
 370 375 380

His Gly Phe Cys Asp Asn Thr Ala Gly Ser Phe Arg Cys Leu Cys Tyr
 385 390 395 400

Gln Gly Phe Gln Ala Pro Gln Asp Gly Gln Gly Cys Val Asp Val Asn
 405 410 415

Glu Cys Glu Leu Leu Ser Gly Val Cys Gly Glu Ala Phe Cys Glu Asn
 420 425 430

Val Glu Gly Ser Phe Leu Cys Val Cys Ala Asp Glu Asn Gln Glu Tyr
 435 440 445

Ser Pro Met Thr Gly Gln Cys Arg Ser Arg Thr Ser Thr Asp Leu Asp
 450 455 460

Val Asp Val Asp Gln Pro Lys Glu Glu Lys Lys Glu Cys Tyr Tyr Asn
 465 470 475 480

Leu Asn Asp Ala Ser Leu Cys Asp Asn Val Leu Ala Pro Asn Val Thr
 485 490 495

Lys Gln Glu Cys Cys Cys Thr Ser Gly Val Gly Trp Gly Asp Asn Cys
 500 505 510

Glu Ile Phe Pro Cys Pro Val Leu Gly Thr Ala Glu Phe Thr Glu Met
 515 520 525

Cys Pro Lys Gly Lys Gly Phe Val Pro Ala Gly Glu Ser Ser Ser Glu
 530 535 540

Ala Gly Gly Glu Asn Tyr Lys Asp Ala Asp Glu Cys Leu Leu Phe Gly
 545 550 555 560

Gln Glu Ile Cys Lys Asn Gly Phe Cys Leu Asn Thr Arg Pro Gly Tyr
 565 570 575

Glu Cys Tyr Cys Lys Gln Gly Thr Tyr Tyr Asp Pro Val Lys Leu Gln
 580 585 590

Cys Phe Asp Met Asp Glu Cys Gln Asp Pro Ser Ser Cys Ile Asp Gly
 595 600 605

046204

Gln Cys Val Asn Thr Glu Gly Ser Tyr Asn Cys Phe Cys Thr His Pro
 610 615 620

Met Val Leu Asp Ala Ser Glu Lys Arg Cys Ile His His His His His
 625 630 635 640

<210> 4
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Asp Tyr Thr Met His
 1 5

<210> 5
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Leu Ile Ser Trp Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 6
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Asp Ala Asp Asp Ser Thr Phe Asp Ile
 1 5

<210> 7
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 8
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 9
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Val Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 10
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Ser Tyr Ala Ile Ser
 1 5

<210> 11
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Gly Ile Ile Pro Met Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 12
 <211> 12
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Asp Arg Glu Trp Glu Pro Ala Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 13
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Ile Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 14
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Ser Ala Tyr Thr Val Ser Ser Thr Trp Val
 1 5 10

<210> 16
 <211> 444
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Val Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Leu Ile Ser Trp Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Ala Asp Asp Ser Thr Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly

046204

435

440

<210> 17

<211> 214

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 17

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Val Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 18

<211> 447

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 18

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Met Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ile Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Arg Glu Trp Glu Pro Ala Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

046204

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

<210> 19

<211> 216

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 19

046204

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ile Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Met Tyr Tyr Cys Ser Ala Tyr Thr Val Ser
 85 90 95
 Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125
 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160
 Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175
 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с комплексом proTGFβ1 человека с преобладающими повторениями гликопротеина А человека (комплекс proTGFβ1-GARP), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с комплексом proTGFβ1 человека с преобладающими повторениями гликопротеина А человека (комплекс proTGFβ1-GARP), при этом указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибирует функцию Treg *in vitro*.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует активацию TGFβ1.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом proTGFβ1 человека, модифицированным в результате образования комплекса с повторениями гликопротеина А человека (GARP).

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, в присутствии полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с proTGFβ1 человека с аффинностью связывания по меньшей мере 880 pM, как измерено с помощью биослойного интерферометрического анализа, где стрептавидиновые биосенсоры нагружали биотинилированным sGARP-proTGFβ1 комплексом при 20 мкг/мл в буфере с ацетатом натрия, pH 5, промывали в том же буфере и переносили в лунки, содержащие 10 мкг/мл кандидатов на комплекс-селективное антитело proTGFβ1-GARP в том же буфере и измеряли константу диссоциации путем нелинейной подгонки откликов к алгоритму установившегося состояния.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с proTGFβ1 человека с константой диссоциации (Kd), меньшей или равной 1 нМ, для комплекса proTGFβ1 человека с преобладающими повторениями гликопротеина А человека (комплекс proTGFβ1-GARP), как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, где указанный комплекс proTGFβ1-GARP находится в растворе.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с комплексом proTGFβ1 человека с преобладающими повторениями гликопротеина А человека (комплекс proTGFβ1-GARP), содержащий:

(i) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотами 1-118 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16 и вариабельную область легкой цепи с аминокислотами 1-107 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17; или

(ii) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с комплексом proTGFβ1 человека с преобладающими повторениями гликопротеина А человека (комплекс proTGFβ1-GARP), содержащее:

(i) вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотами 1-121 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18 и вариабельную область легкой цепи с аминокислотами 1-110 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19; или

(ii) область тяжелой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18 и область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 19.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с комплексом proTGFβ1-GARP человека и содержит переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 1-118 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, и переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 1-107 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с комплексом proTGFβ1-GARP человека и содержит переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 1-121 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 1-110 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab-фрагмент, Fab2-фрагмент или одноцепочечное антитело.

14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент являются рекомбинантными.

15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеют изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.15, где антитело имеет изотип IgG4.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с комплексом proTGFβ1-GARP человека, когда указанный комплекс находится в растворе, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не имеют обнаруживаемого связывания в соответствии с анализом интерферометрии биослоев, где стрептавидиновые биосенсоры загружены биотинилированным комплексом sGARP-proTGFβ1 при концентрации 20 мкг/мл в ацетатно-натриевом буфере, pH 5, промытым в том же буфере и перенесенным в лунки, содержащие 10 мкг/мл кандидатов на комплексно-селективные антитела proTGFβ1-GARP в том же буфере, и измерении константы диссоциации путем нелинейной подгонки ответов к алгоритму устойчивого состояния на любой из следующих агентов:

домен фактора роста TGFβ1;

домен фактора роста TGFP2;

домен фактора роста TGFP3;

proTGFβ1, ковалентно связанный с LTBP1;

proTGFβ1, ковалентно связанный с LTBP3;

proTGFβ1, ковалентно связанный с LRRC33; и

proTGFβ1, не связанный с GARP человека; и

кроме того, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют ингибирующую концентрацию (IC50), меньшую или равную 10 нМ, для ингибирования высвобождения фактора роста TGFβ1 из ассоциированного с клеткой комплекса proTGFβ1-GARP, измеренного в клетках TMLC с интегрированной единицей экспрессии люциферазы TGFβ/Smad3 при 37°C.

18. Полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов.

19. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.18.

20. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.19.

21. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, включающий:

культивирование клетки-хозяина по п.20 в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и

выделение антитела или антигенсвязывающей молекулы из культуры.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-17 и фармацевтически приемлемый носитель.

23. Набор для определения присутствия комплекса proTGFβ1-GARP в биологическом образце, включающий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-17 и один или более из:

(a) реагентов для обнаружения присутствия комплекса proTGFβ1-GARP в биологическом образце;

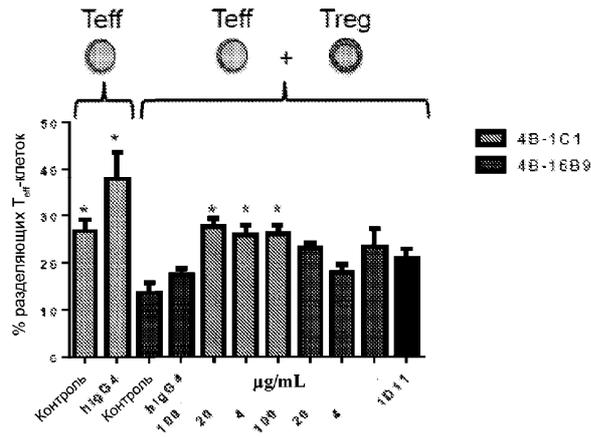
(b) средств для получения образца от субъекта;

(c) контрольных или эталонных образцов;

(d) одного или нескольких отделений для проб;

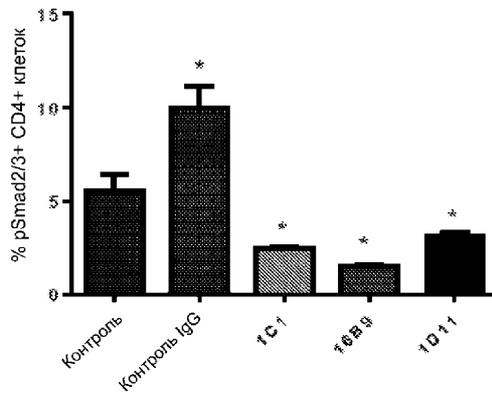
а также его упаковку.

24. Набор по п.23, дополнительно содержащий инструкцию по применению.



* p < 0,01 по сравнению с контролем IgG + Treg с использованием одностороннего ANOVA Даннета

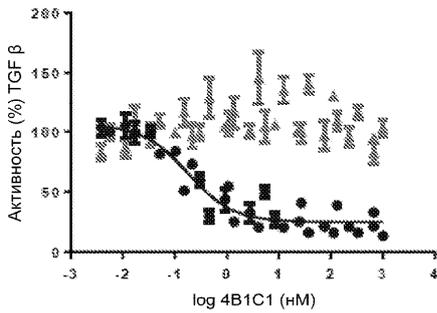
Фиг. 1



* p < 0,005 по сравнению с контролем с использованием однофакторному анализу Даннета ANOVA

Фиг. 2

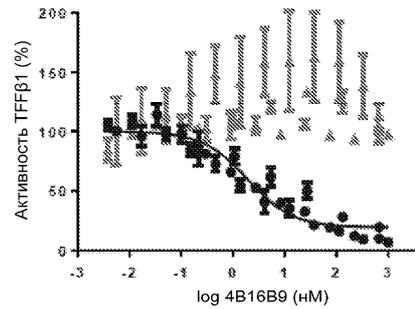
Клон 4B1C1



Комплекс GARP-proTGβ1:
IC50=0,178 нМ (0,124–0,256 нМ)

Комплекс LTBP1-proTGβ1:
Ингибирование отсутствует

Клон 4B16B9



Комплекс GARP-proTGβ1:
IC50 = 1,9 нМ (1,4–2,7 нМ)

Комплекс LTBP1-proTGβ1:
Ингибирование отсутствует

Фиг. 3

Аффинность КD (nM)										
Клон	hGARP- proTGFβ1	hGARP- TGFβ1- LAP	mGARP- proTGFβ1	rGARP- proTGFβ1	hLTBP1- proTGFβ1	hLTBP3- proTGFβ1	TGFβ1	TGFβ2	TGFβ3	hLRRC3- pro- TGFβ1
4B1C1	0,114±0,004	11,3±1,2	Нет связывания	0,187±0,007	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
4B16B9	0,002±0,03	Нет связывания	Нет связывания	0,158±0,012	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания

Фиг. 4

