

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392878** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.05.31

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.22

(54) **БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ TGF-бета-RII**

(31) **2024576**

(32) **2019.12.24**

(33) **NL**

(62) **202291884; 2020.12.22**

(71) Заявитель:
МЕРУС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:

**Тросби Марк, Кластер Ринс, Де Крёйф
Корнелис Адриаан (NL)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к антителу или фрагменту указанного антитела, который специфично связывается с внеклеточным доменом TGF- β RII человека. Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению, выделенной клетке, продуцирующей антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению, и фармацевтической композиции, содержащей антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению. Антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению можно применять для лечения рака.

202392878

A2

A2

202392878

БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ TGF-бета-RII

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области медицины. Более конкретно? настоящее изобретение относится к белкам, которые связывают рецептор II трансформирующего фактора роста-бета (TGF- β RII), а также к их применению при лечении людей, в частности, при лечении рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Трансформирующий фактор роста- β (TGF- β , ТФР-бета) представляет собой сигнальную молекулу, входящую в суперсемейство TGF- β . Существуют три лиганда TGF- β (TGF- β 1, 2 и 3), которые регулируют ряд клеточных функций. Передача сигналов TGF- β играет роль в подавлении опухолей в нормальных клетках, но может играть роль стимулирования опухоли в злокачественных клетках. Они участвуют в таких процессах как пролиферация, миграция, дифференцировка, апоптоз, ангиогенез и эпителиально-мезенхимальный переход (Bierie and Moses, 2006. Siegel and Massague, 2003). Эти сигналы опосредуются связыванием с рецептором TGF- β 2 типа (TGF- β RII), которое приводит к димеризации с TGF- β RI и его фосфорилированию. Этот гетеротетрамерный комплекс, состоящий из двух TGF- β RII и двух TGF- β RI, затем привлекает и фосфорилирует SMAD2 и SMAD3, который, в свою очередь, привлекает и связывает ко-SMAD молекулу SMAD4 с образованием комплекса SMAD/ко-SMAD и перемещается в ядро, где он регулирует транскрипцию генов-мишеней TGF- β (Hata and Chen, 2016. Vander Ark, Cao et al., 2018).

Было показано, что высокие уровни экспрессии TGF- β связаны с неблагоприятным прогнозом при раке. TGF- β может индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход, который облегчает миграцию и метастазирование раковых клеток. Профили экспрессии генов показали, что передача сигналов TGF- β является важным путем при метастазировании колоректального рака в печень (Jung, Staudacher et al., 2017). Кроме того, сообщалось, что стромально-эпителиальные взаимодействия играют некоторые роли в прогрессировании рака. Распространенный стромальный клеточный компонент, обнаруженный в солидных опухолях, представляет собой ассоциированные с раком фибробласты (CAF), которые помимо построения и ремоделирования внеклеточного матрикса, который может служить каркасом для опухоли, также способствуют уклонению от иммунного надзора, а также стимулируют развитие и рост опухоли (Quail and Joyce, 2013). TGF- β 1 опухолевого происхождения индуцирует транс-дифференцировку фибробластов в «активированные» CAF путем связывания с TGF β RII, который способен стимулировать протуморогенную стромальную среду.

Существующие на сегодняшний день способы нацеливания на сигнальный путь TGF- β для ингибирования признаков aberrантной передачи сигналов TGF- β для САФ и опухолей имеют субоптимальные эффективность и/или потенциал для разработки. Одно моноклональное антитело к TGF- β RII представляет собой LY3022859, раскрытое в WO2010/053814, которое, как сообщается, блокирует эктодомен TGF- β RII. Однако исследования с повышением дозы в фазе I приводили к синдрому высвобождения цитокинов и считались небезопасными у пациентов с солидными опухолями на поздних стадиях. Другой агент, раскрытый в WO2012/093125, представляет собой одиночный переменный домен против TGF- β RII с более коротким периодом полужизни, при этом точный механизм действия или связывающий домен этой молекулы не установлен. На сегодняшний день не существует антитела к TGF- β RII, которое успешно прошло клинические исследования, поскольку сложность и плеiotропный характер регуляции опухоли с участием TGF- β затрудняют разработку лекарственных средств (Hao, Baker et al., 2019). В настоящем документе мы описываем новые переменные области тяжелой цепи, тяжелые цепи, Fab и полноразмерные моносpezifичные антитела IgG, способные связывать TGF- β RII. Эти антитела или антитела, содержащие эти тяжелые цепи или переменные области тяжелой цепи, нацелены на новое положение на TGF- β RII и блокируют взаимодействие между рецептором и его лигандом, что представляет собой улучшение по сравнению с существующими антителами.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Задачей настоящего изобретения является обеспечение нового фармацевтического агента для лечения заболеваний человека, в частности, для лечения рака. Эта задача решается за счет обеспечения антитела или его фрагмента антитела, а также конкретных связывающих доменов, которые специфично связываются с внеклеточным доменом TGF- β RII человека, как описано и заявлено в настоящем документе.

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к антителу или фрагменту антитела, которое(ый) специфично связывается с внеклеточным доменом TGF- β RII человека, причем указанное антитело или фрагмент антитела связывается с эпитопом внеклеточного домена TGF- β RII человека, в котором фенилаланин (F) в положении 25 изоформы А TGF- β RII человека или в положении 50 изоформы В TGF- β RII человека является критично важным остатком для связывания.

Предпочтительно такое антитело или фрагмент антитела связывается с TGF- β RII, блокирует или ингибирует связывание TGF- β человека с TGF- β RII человека, что

ингибирует передачу сигнала в клетку и блокирует или ингибирует гетеродимеризацию TGF- β RII.

5 Согласно второму аспекту настоящее изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий любую из тяжелой цепи и легкой цепи или обе указанные цепи антитела или фрагмента антитела, описанного в настоящем документе.

Согласно третьему аспекту настоящее изобретение относится к клетке, продуцирующей антитело или фрагмент антитела, описанный в настоящем документе.

10 Согласно четвертому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или фрагмент антитела, описанный в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

15 Согласно пятому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтическому агенту для предотвращения, подавления прогрессирования симптомов или рецидива и/или лечения рака, причем указанный фармацевтический агент содержит антитело или фрагмент антитела, описанный в настоящем документе, в качестве активного ингредиента.

20 Согласно шестому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, причем указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества антитела или фрагмента антитела, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

25 Согласно седьмому аспекту настоящее изобретение относится к способу блокирования связывания TGF- β человека с TGF- β RII человека на клетке, причем указанный способ включает доставку антитела или фрагмента антитела, описанного в настоящем документе, к клетке и обеспечение связывания антитела или фрагмента антитела с TGF- β RII человека клетки, с блокированием таким образом связывания TGF- β человека с TGF- β RII человека на клетке.

30 Согласно восьмому аспекту настоящее изобретение относится к способу ингибирования передачи сигнала в клетку, индуцированной связыванием TGF- β человека с TGF- β RII человека клетки, причем указанный способ включает доставку антитела или фрагмента антитела, описанного в настоящем документе, к клетке и обеспечение связывания антитела или фрагмента антитела с TGF- β RII человека клетки, с ингибированием таким образом передачи сигнала в клетку.

Согласно девятому аспекту настоящее изобретение относится к способу предотвращения или ингибирования метастазирования, причем указанный способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или фрагмента антитела, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В целом настоящее изобретение относится к белку, в частности, к антителу или фрагменту указанного антитела, который специфично связывается с внеклеточным доменом TGF- β RII человека. Предпочтительно антитело является выделенным. Предпочтительно антитело представляет собой моноклональное антитело. Более предпочтительно антитело представляет собой выделенное моноклональное антитело.

«Выделенное моноклональное антитело» относится к антителу, продуцируемому клональной клеткой. Примеры выделенных антител включают, но не ограничиваются перечисленными, антитело, прошедшее аффинную очистку, антитело, продуцированное в гибридоме или другой клеточной линии *in vitro*, и человеческое антитело, полученное из трансгенного животного, отличного от человека.

Термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, содержащей четыре полипептидные цепи: две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и константную область тяжелой цепи (CH). Переменная область тяжелой цепи содержит три определяющих комплементарность участка тяжелой цепи (HCDR) и четыре каркасных участка (FR) и предпочтительно является человеческой или гуманизированной. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3; и может быть получена из любого организма, предпочтительно человека. Домены CH1 и CH2 константной области тяжелой цепи соединены гибкой шарнирной областью. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи (CL). Переменная область легкой цепи может быть двух типов: каппа (κ) или лямбда (λ) и, как и VH, содержит три определяющих комплементарность участка легкой цепи (LCDR) и четыре каркасных участка. Переменная область легкой цепи предпочтительно является человеческой или гуманизированной. Константная область легкой цепи состоит из одного домена: CL; и может быть получена из любого организма, предпочтительно человека. Две тяжелые цепи связаны друг с другом дисульфидными связями между двумя шарнирными областями, и каждая тяжелая цепь спаривается с легкой цепью дисульфидной связью между областями CH1 и CL. В обычном антителе две тяжелые цепи и две легкие цепи

идентичны, что обеспечивает антитело с двумя идентичными антигенсвязывающими сайтами.

Связывание антитела имеет различные характеристики, включая специфичность и аффинность. Специфичность определяет, какой антиген или его эпитоп специфично связывается связывающим доменом антитела. Аффинность представляет собой меру силы связывания с конкретным антигеном или эпитопом.

«Человеческое» антитело относится к антителу, в котором все домены антитела происходят из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческое антитело, подлежащее применению в настоящем изобретении, может быть получено способом с использованием мыши, трансформированной для продуцирования человеческого антитела, например, мыши Hmab, мыши KM, мыши Xeno, мыши Tc или мыши MeMo[®] (WO2009/157771). Человеческое антитело также может быть получено с использованием мышей SCID, у которых человеческие иммунные клетки были реконструированы так, что после иммунизации возникает ответ человеческого антитела.

«Гуманизованная» область антитела относится к антителу, полученному, например, путем прививки последовательности определяющей комплементарность участка (CDR) антитела, полученной из зародышевой линии животного, отличного от человека, такого как мышь или курица, в человеческие каркасные последовательности человеческого антитела. Гуманизованное антитело также может быть получено путем связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей участка CDR антитела, выделенного из гибридомы, продуцирующей антитело, с нуклеиновой кислотой, кодирующей каркасный участок антитела человеческого происхождения, с использованием хорошо известного метода.

Антитело способно связывать антиген посредством своих переменных областей тяжелой цепи и/или легкой цепи и, в частности, посредством своих специфичных CDR. CDR переменных областей тяжелой и/или легкой цепи антитела связываются с «эпитопом», также называемым «антигенной детерминантой», антигена. Эпитопы могут быть образованы из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, сближенных третичной укладкой белка, так называемые линейные и конформационные эпитопы, соответственно. Эпитопы, образованные из смежных линейных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как конформация эпитопов, образованных третичной укладкой, обычно теряется при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно может включать 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

«Антиген» обычно представляет собой молекулу, способную индуцировать иммунный ответ в организме хозяина с продуцированием антител, специфичных в отношении антигена. На молекулярном уровне антиген характеризуется его способностью к связыванию антигенсвязывающим сайтом антитела. Как описано выше, антигенсвязывающий сайт антитела образован его вариабельными областями тяжелой и/или легкой цепи и, в частности, его CDR. Антиген содержит по меньшей мере один, но обычно более, эпитопов.

10 Смеси антигенов также могут рассматриваться как «антиген», и обычный специалист в данной области техники поймет, что иногда лизат опухолевых клеток или вирусные частицы могут быть указаны как «антиген», в то время как такой лизат опухолевых клеток или препарат вирусных частиц состоит из многих антигенных детерминант.

В настоящем изобретении антиген представляет собой TGF- β RII человека. TGF- β RII человека представляет собой трансмембранный белок, у которого существуют различные изоформы. Аминокислотная последовательность изоформы А TGF- β RII человека представлена как SEQ ID NO: 101; аминокислотная последовательность внеклеточного домена изоформы А TGF- β RII человека представлена как SEQ ID NO: 102. Изоформа В TGF- β RII человека представляет собой вариант сплайсинга, кодирующий более длинную изоформу из-за вставки во внеклеточный домен. Аминокислотная последовательность изоформы В TGF- β RII человека представлена как SEQ ID NO: 103; аминокислотная последовательность внеклеточного домена изоформы В TGF- β RII человека приведена в SEQ ID NO: 104.

TGF- β RII является членом семейства серин/треониновых протеинкиназ и подсемейства рецепторов TGF β . Он известен под различными синонимами, включая TGFBR2, AAT3, FAA3, LDS1B, LDS2, LDS2B, MFS2, RIIС, TAAD2, TGFR-2, TGFбета-RII, рецептор трансформирующего фактора роста бета 2 и TBR-ii, TBRII. TGF- β RII образует гетеродимерный комплекс с другим рецепторным белком и связывает TGF-бета. Этот комплекс рецептор/лиганд фосфорилирует белки, которые затем проникают в ядро и регулируют транскрипцию субпопуляции генов, связанных с пролиферацией клеток.

30 Антитело связывает антиген с определенной аффинностью связывания. «Аффинность связывания» определяется константой диссоциации (K_D), рассчитываемой по формуле: k_{off}/k_{on} , и относится к силе взаимодействия антитела с антигеном. В

зависимости от желаемой биологической активности антитело может быть выбрано на основании его высокой и/или низкой скорости k_{on} и/или k_{off} .

«Фрагмент антитела» включает, но не ограничивается этим, функциональный фрагмент тяжелой цепи и/или легкой цепи. Такой функциональный фрагмент содержит по меньшей мере один CDR, полученный из CDR тяжелой или легкой цепи антитела, или синтезированный на его основе, и способен специфично распознавать антиген. Фрагмент антитела может представлять собой, например, но не ограничивается перечисленными, Fab, F(ab')₂, scFv, минитело или sdAb. «Фрагмент антитела» также относится к белковому фрагменту, содержащему функциональную часть антитела. В данном случае по меньшей мере 10 5 10 15 20 25 30

мере переменная область тяжелой цепи или один или более HCDR, описанных в настоящем документе. Фрагмент антитела может представлять собой любой связывающий агент, включая, но не ограничиваясь перечисленными, одноцепочечные Fv, одноцепочечные или тандемные антитела (TandAb[®]), VHH, антикарины[®], нанотела[®], BiTE[®], Fab, белки с анкириновыми повторами или DARPIN[®], авимеры[®], DART, TCR-подобное антитело, аднектины[®], аффилины[®], транстела[®], аффитела[®], тример X[®], микробелки, финомеры[®], центирины[®] или KALBITOR[®].

«Fab» обычно означает связывающий домен, содержащий переменную область тяжелой цепи, переменную область легкой цепи, CH1 и область CL.

«F(ab')₂» обычно означает связывающий домен, содержащий два домена Fab, связанные друг с другом посредством шарнирной области.

«Одноцепочечный переменный фрагмент» (scFv) обычно означает связывающий домен, содержащий домен VH и домен VL, которые соединены линкером, например, пептидным линкером, например, содержащим от примерно 10 до примерно 25 аминокислот в длину.

«Минитело» обычно означает связывающий домен, содержащий два scFv и домен CH3.

«Однодоменное антитело» (sdAb) обычно означает связывающий домен, содержащий только домен VH или VL антитела, обычно слитый или связанный иным образом с областью Fc или ее частью. Подобно целому антителу оно способно селективно связываться с конкретным антигеном. Фрагменты однодоменных антител можно сконструировать из антител с тяжелой цепью, обнаруженных у верблюдовых; их иногда называют фрагментами VHH (нанотела[®]). У некоторых рыб также есть антитела только с тяжелой цепью (IgNAR, «иммуноглобулиновый новый антигенный рецептор»), из которых можно получить фрагменты однодоменных антител, называемые фрагментами

VNAR. Альтернативный подход заключается в разделении димерных переменных доменов из обычного иммуноглобулина G (IgG) человека или мыши на мономеры. Хотя большинство исследований однодоменных антител в настоящее время основано на переменных доменах тяжелой цепи, также было показано, что нанотела, полученные из легких цепей, способны связываться с целевыми эпитопами. Таким образом, нанотела также охватываются настоящим изобретением.

«Фрагмент антитела» также относится по меньшей мере к одному CDR, причем указанный по меньшей мере один CDR является частью белковой конструкции, проявляющей специфичность связывания в отношении антигена. Предпочтительно по меньшей мере один CDR представляет собой HCDR3. Согласно одному варианту реализации белковая конструкция содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3. Согласно другому варианту реализации белковая конструкция содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Белковая конструкция также может содержать область Fc или ее часть, включая CH2 и/или CH3. Белковая конструкция также может содержать область CH1. Области CH1, CH2 и/или CH3 могут быть сконструированы для получения любых желаемых свойств в отношении связывания антигена и/или эффекторной функции.

Настоящее изобретение также охватывает варианты антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению. «Вариант» антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере функциональную часть антитела или фрагмента антитела, описанного в настоящем документе, или их производное или аналог. Такая функциональная часть, производное или аналог содержит по меньшей мере связывающий домен антитела или фрагмента антитела, описанного в настоящем документе, включая переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи, содержащую CDR, как раскрыто в настоящем документе. Вариант может содержать от одной до пяти аминокислотных замен в одном или более из CDR. Например, аминокислотный остаток может быть заменен консервативным аминокислотным остатком. Вариант также может содержать одну или более аминокислотных замен в одном или более каркасных участках. Предпочтительно вариант содержит область VH, последовательность которой по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности VH антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению. Предпочтительно вариант содержит область VL, последовательность которой по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной

последовательности VL антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению.

«Процент (%) идентичности» применительно к последовательностям нуклеиновых кислот или аминокислот в настоящем документе определяется как процент остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны остаткам в выбранной последовательности после выравнивания последовательностей для целей оптимального сравнения. Чтобы оптимизировать выравнивание между двумя последовательностями, в любую из двух сравниваемых последовательностей могут быть введены пробелы. Такое выравнивание можно проводить по всей длине сравниваемых последовательностей. В качестве альтернативы, выравнивание можно проводить по участку более короткой длины, например, примерно 20, примерно 50, примерно 100 или более нуклеиновых кислот/оснований или аминокислот. Идентичность последовательностей представляет собой процент идентичных совпадений между двумя последовательностями в сообщенной выравненной области.

Сравнение последовательностей и определение процента идентичности последовательностей между двумя последовательностями можно выполнять с использованием математического алгоритма. Специалисту в данной области техники известно, что доступно несколько различных компьютерных программ для выравнивания двух последовательностей и определения идентичности между двумя последовательностями (Kruskal, J. B. (1983) An overview of sequence comparison In D. Sankoff and J. B. Kruskal, (ed.), Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, pp. 1 -44 Addison Wesley).

В частности, процент идентичности последовательностей в соответствии с настоящим изобретением, изложенным в настоящем документе, между двумя последовательностями нуклеиновых кислот может быть определен с использованием приложения AlignX программного обеспечения Vector NTI Program Advance 11.5.2 с использованием настроек по умолчанию, в котором применяется модифицированный алгоритм ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson T.J. (1994) Nuc. Acid Res. 22: 4673-4680), оценочная матрица swgapdnam, штраф за введение пробела 15 и штраф за продолжение пробела 6,66. Аминокислотные последовательности могут быть выравнены с использованием приложения AlignX программного обеспечения Vector NTI Program Advance 11.5.2 с использованием настроек по умолчанию, в котором применяется модифицированный алгоритм ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson T.J.,

1994), оценочная матрица *blosum62mt2*, штраф за введение пробела 10 и штраф за продолжение пробела 0,1.

Вариант сохраняет специфичность связывания антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению, например, специфичность в отношении антигена.

5 Однако аффинность связывания варианта может отличаться от аффинности исходного антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению. Вариант может иметь, например, более низкую или более высокую скорость K_{on} и/или K_{off} , чем антитело или фрагмент антитела, описанный в настоящем документе.

10 Функциональное производное антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению может представлять собой миметик антитела, полипептид, аптамер или их комбинацию. Эти белки или аптамеры обычно связываются с одной мишенью. Следует понимать, что любая комбинация этих антител, миметиков антител, полипептидов и аптамеров может быть связана вместе способами, известными в данной области техники. Например, согласно некоторым вариантам реализации антитело или
15 фрагмент антитела согласно настоящему изобретению представляет собой конъюгат или часть слитого белка.

Миметик антитела представляет собой полипептид, который, как и антитела, может специфично связывать антиген, но структурно не связан с антителами. Миметики антител обычно представляют собой искусственные пептиды или белки с молекулярной массой
20 примерно 3-20 кДа. Неограничивающими примерами миметиков антител являются молекулы аффител (обычно на основе домена Z белка A); аффилины (обычно на основе гамма-кристаллина B или убиквитина); аффимеры (обычно на основе цистатина); аффитины (обычно на основе Sac7d из *Sulfolobus acidocaldarius*); альфа-тела (обычно на основе суперспирали с тройной спиралью); антикалины (обычно на основе липокалинов);
25 авимеры (обычно на основе A-доменов различных мембранных рецепторов); DARPin (обычно на основе мотива анкиринового повтора); финомеры (обычно на основе домена SH3 Fyn 7); пептиды домена Куница (обычно на основе доменов Куница различных ингибиторов протеаз); и монотела (обычно на основе домена типа III фибронектина).

Монотела представляют собой синтетические связывающие белки, которые
30 сконструированы с использованием домена типа III фибронектина (FN3) в качестве молекулярного каркаса. Монотела являются альтернативой антителам для создания белков, связывающих мишень. Монотела и другие миметики антител обычно получают из комбинаторных библиотек, в которых части каркаса диверсифицированы с

использованием технологий молекулярного дисплея и направленной эволюции, таких как фаговый дисплей, дисплей мРНК и дисплей на поверхности дрожжей.

Аптамеры представляют собой молекулы олигонуклеотидов или пептидов, которые связываются с конкретной молекулой-мишенью. Аптамеры обычно создают путем их
5 отбора из большого пула случайных последовательностей, но природные аптамеры также существуют в рибопереключателе. Аптамеры можно использовать в виде макромолекул как для фундаментальных исследований, так и для клинических целей.

Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой антитело IgG, предпочтительно антитело IgG1 или IgG4. Наиболее предпочтительно
10 антитело представляет собой антитело IgG1. Такое полноразмерное антитело IgG является предпочтительным из-за его благоприятного периода полужизни и желания оставаться как можно ближе к полностью аутологичным (человеческим) молекулам по причинам иммуногенности. IgG1 является предпочтительным на основании его длительного периода полужизни в кровотоке у человека.

Термин «полноразмерный IgG» или «полноразмерное антитело» в соответствии с
15 настоящим изобретением определяется как содержащий по существу полный IgG, который, однако, не обязательно обладает всеми функциями интактного IgG. Во избежание сомнений, полноразмерный IgG содержит две тяжелые и две легкие цепи. Каждая цепь содержит константную (C) и переменную (V) области, которые можно
20 разделить на домены, обозначенные CH1, CH2, CH3, VH и CL, VL. Антитело IgG связывается с антигеном за счет доменов переменной области, содержащихся в части Fab, и после связывания может взаимодействовать с молекулами и клетками иммунной системы посредством константных доменов, преимущественно посредством части Fc. Полноразмерные антитела в соответствии с настоящим изобретением охватывают
25 молекулы IgG, в которых могут присутствовать мутации, обеспечивающие желаемые характеристики.

Полноразмерный IgG может содержать вариации константных областей для модуляции эффекторной функции, как усиливающие, так и ослабляющие такие функции, включая антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) или
30 клеточнозависимую цитотоксичность (КЗЦ), для увеличения гомо- или гетеродимеризации для получения моноспецифичных или мультиспецифичных антител из клеток-хозяев, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую разные тяжелые цепи, и для облегчения отделения антител или фрагментов антител, продуцируемых такими клетками-хозяевами.

Например, лейцин в положении 235 в соответствии с системой нумерации ЕС может быть заменен глицином, и/или глицин в положении 236 в соответствии с системой нумерации ЕС может быть заменен аргинином. Такая(ие) модификация(ии) гарантирует(ют), что связывание с рецептором Fc и/или эффекторная функция
5 устраняется или уменьшается. Другие вариации СН2 и области Fc с таким же эффектом, известные в данной области техники, также охватываются настоящим изобретением.

Полноразмерный IgG не должен иметь делеций существенных частей любой из областей. Однако молекулы IgG, в которых один или несколько аминокислотных остатков удалены без существенного изменения характеристик связывания полученной молекулы
10 IgG, охватываются термином «полноразмерный IgG». Например, такие молекулы IgG могут иметь делецию от 1 до 10 аминокислотных остатков, предпочтительно в областях, отличных от CDR, причем делетированные аминокислоты не являются существенными для специфичности связывания IgG.

Например, может быть удален лизин в положении 447 в соответствии с системой
15 нумерации ЕС. Такая делеция снижает гетерогенность антитела. Кроме того, для подавления обмена в молекуле антитела IgG4 серин, расположенный в шарнирной области в положении 228 в соответствии с системой нумерации ЕС, может быть заменен пролином.

Легкие цепи, подходящие для применения в антителе или фрагменте антитела
20 согласно настоящему изобретению, включают легкую цепь, которая продуцируется в ответ на иммунизацию антигеном, называемую когнатной легкой цепью, или легкую цепь, полученную на ее основе синтетическим путем. Подходящая легкая цепь также включает общую легкую цепь (сLC), такую как те, которые могут быть идентифицированы путем скрининга наиболее часто применяемых легких цепей в существующих библиотеках
25 антител (влажные библиотеки или *in silico*), где легкие цепи существенно не нарушают аффинность и/или селективность эпитоп-связывающих доменов тяжелых цепей, но также подходят для спаривания с набором тяжелых цепей. Общая легкая цепь предпочтительно кодируется последовательностями зародышевой линии V и J генных сегментов, которые перегруппированы, но не подверглись или подверглись минимальной соматической
30 гипермутации. Например, подходящая легкая цепь включает одну из трансгенного животного, отличного от человека, такого как MeMo[®], имеющего общую легкую цепь, интегрированную в его геном, и которую можно использовать для создания больших панелей антител с общей легкой цепью, имеющих разнообразие в тяжелой цепи и способных специфично связывать антиген при воздействии указанного антигена.

Таким образом, термин «общая легкая цепь» относится к легкой цепи, которая может быть связана с двумя или более различными тяжелыми цепями и проявляет способность связываться с антигеном (см., например, WO2009/157771, WO2019/190327 и WO2014/051433). Предпочтительный V-ген легкой цепи для такой общей легкой цепи представляет собой IGKV1-39. Предпочтительные J-гены легкой цепи представляют собой jk1 и jk5. Соединенные последовательности обозначены как IGKV1-39/jk1 и IGKV1-39/jk5; альтернативные названия: IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 или IgVκ1-39*01/IGJκ5*01 (номенклатура в соответствии с базой данных IMGT в Интернете по адресу imgt.org). Предпочтительные примеры общей легкой цепи включают легкую цепь, кодируемую геном легкой κ-цепи зародышевой линии человека IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 (номенклатура базы данных IMGT) (далее сокращенно «общая легкая цепь IGVK1-39/JK1»), а также IgVκ1-39*01/IGJκ5. Различные трансгенные животные MeMo[®], упомянутые выше, содержат общую легкую цепь IGVK1-39/JK1.

Общая легкая цепь в соответствии с настоящим изобретением также относится к легким цепям, которые могут быть идентичными или могут иметь некоторые отличия по аминокислотной последовательности, при этом специфичность связывания антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению не затрагивается. Обычные специалисты в данной области техники поймут, что «общий» также относится к функциональным эквивалентам легкой цепи, аминокислотная последовательность которых не является идентичной. Существуют варианты указанной легкой цепи, в которых присутствуют изменения по сравнению с исходной общей легкой цепью, которые существенно не влияют на образование функциональных связывающих областей. Таким образом, такие варианты также способны связывать различные тяжелые цепи и образовывать функциональные антигенсвязывающие домены. Например, в рамках определения общих легких цепей, используемого в настоящем документе, можно приготовить или найти переменные легкие цепи, которые не являются идентичными, но все же функционально эквивалентны, например, путем введения и тестирования консервативных аминокислотных изменений, изменений аминокислот в областях, которые не вносят вклада или лишь частично вносят вклад в специфичность связывания при спаривании с когнатной цепью, и т.п. Таким образом, такие варианты также способны связывать различные когнатные цепи и образовывать функциональные антигенсвязывающие домены. Таким образом, термин «общая легкая цепь» в контексте настоящего документа относится к легким цепям, которые могут быть идентичными или могут иметь некоторые отличия по аминокислотной последовательности, сохраняя при

этом специфичность связывания полученного антитела после спаривания с тяжелой цепью. Комбинация определенной общей легкой цепи и таких функционально эквивалентных вариантов охватывается термином «общая легкая цепь». Приведена ссылка на WO 2004/009618, WO2019/190327 и WO2009/157771 для подробного описания применения общих легких цепей. Предпочтительно в настоящем изобретении используется общая легкая цепь, которая представляет собой легкую цепь, подобную таковой зародышевой линии, более предпочтительно легкую цепь зародышевой линии, предпочтительно перегруппированную легкую каппа-цепь зародышевой линии человека, наиболее предпочтительно перегруппированную легкую каппа-цепь зародышевой линии человека IgVκ1-39/Jκ или IGVκ3-20/Jκ.

Антитело или фрагмент антитела можно получить, например, из гибридомы с использованием гибридомного метода. В качестве альтернативы, антитело или фрагмент антитела можно получить путем секреции из клетки млекопитающего, коэкспрессирующей тяжелые и/или легкие цепи или их фрагменты. Предпочтительно антитело или фрагмент антитела получают путем иммунизации животного, отличного от человека. Эти и другие способы известны в данной области техники и могут быть подходящим образом использованы для получения антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению.

Антитела могут быть получены из различных видов животных. Подходящим образом можно использовать трансгенных животных MeMo[®], упомянутых выше, содержащих общую легкую цепь IGVκ1-39/Jκ1. Обычно трансгенных мышей иммунизируют целевой ДНК и/или белком человека с последующими стимулирующими иммунизациями, что вызывает иммунный ответ, включая продукцию антиген-специфичных антител. Сывороточные титры у иммунизированных мышей можно определить с помощью анализа методом ИФА и FACS. Затем можно собрать селезенку и дренированный лимфоидный материал иммунизированных мышей и получить суспензии отдельных клеток. Можно выделить РНК и синтезировать кДНК, которые кодируют тяжелую цепь и/или переменные области таких антител. Затем можно выполнить ПЦР, специфичную для семейства VH и/или VL, для создания библиотек фагового дисплея. Затем можно отобрать Fab, связывающие целевой белок человека, с использованием, например, робота для отбора Kingfisher. Нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную область тяжелой цепи и/или легкой цепи Fab, которые связывают целевой белок, можно использовать для продукции антител в клетках-хозяевах.

В некоторых случаях иммунизация трансгенного организма приводит к продукции антител, но такие антитела не являются перекрестно-реактивными для человека и трансгенного животного, что делает анализ и тестирование таких антител менее эффективным. Соответственно, полезным может быть получение связывающих доменов или антител, включая химерные или гуманизированные связывающие домены или антитела, которые содержат переменные области и/или определяющие комплементарность участки (CDR), и нуклеиновых кислот, которые кодируют указанные переменные области и/или CDR, которые основаны, происходят или получены из нуклеиновой кислоты из видов, эволюционно далеких от человека. Одним потенциальным источником таких переменных областей могут быть птицы, например, одомашненные птицы, такие как куры, утки или страусы. Репертуары антител, полученные при иммунизации птиц, например, кур, уток или страусов, могут идентифицировать уникальные эпитопы при сравнении с антителами, полученными при иммунизации мышей или других видов, эволюционно близких к человеку (например, грызунов и яванских макаков).

Первичная иммунизация ДНК или белком может быть проведена с последующими дополнительными стимулирующими иммунизациями. Антитела IgY могут быть выделены из желтка собранных яиц или сыворотки иммунизированных птиц. У птиц со значительным гуморальным ответом против целевого белка извлекают селезенку и/или костный мозг. Затем можно выделить РНК и синтезировать кДНК. Полученные образцы кДНК затем используют в качестве матрицы для амплификации и расщепления генов VH и/или VL с использованием двух праймеров. Продукты ПЦР затем клонируют в фагмидный вектор для экспонирования фрагментов Fab на фаге, по существу так, как описано в de Haard et al. (J Biol Chem. (1999), Vol. 274(26), pp. 18218-18230). Нуклеиновые кислоты, кодирующие области VH и/или VL, лигируют в вектор, и полученный лигированный вектор трансформируют в клетки с получением библиотек. Затем можно выполнить отборы методом пэннинга с использованием KingFisher Flex, чтобы отобрать фаги, которые связывают целевой белок. Скрининг можно проводить с помощью FACS на клетках, экспрессирующих целевой белок человека или мыши. Гены VH и/или VL всех клонов, которые специфично связывают целевой белок человека и/или мыши, секвенируют. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи и/или легкой цепи связывающего домена, который связывает целевой белок, может быть использована для продукции антител в клетках-хозяевах.

Фрагменты антител могут быть получены способами, известными в данной области техники.

Антитела scFv могут быть получены путем выделения мРНК из гибридомы или клетки млекопитающего, которая затем подвергается обратной транскрипции в кДНК для ПЦР-амплификации. Это приводит к получению больших библиотек, содержащих разнообразный диапазон генов VH и VL антител (Marks and Hoogenboom, *Journal of Molecular Biology* (1991), Vol. 222, pp. 581-597). При конструировании scFv домены могут быть расположены как VH-линкер-VL или как VL-линкер-VH (Hu, O'Dwyer and Wall, *Journal of Biotechnology* (2005), Vol. 120, pp. 38-45). Примером линкера может быть классический линкер (G4S)₃ (Huston et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (1988), Vol. 85, pp. 5879-5883). Для минител фрагмент ДНК, кодирующий шарнир-домен CH3, может основываться, например, на последовательностях IgG1 человека (Kim et al., *PLOS One* (2014), Vol. 9(12), e113442). scFv и области шарнир-CH3 могут быть собраны либо путем лигирования липких концов, полученных с помощью XhoI и SALI, либо с помощью ПЦР для переноса сайта рестрикции XhoI продукта scFv вместе с шарниром на NH₂-конец CH3 (Hu et al., *Cancer Research* (1996), Vol. 56, pp. 3055-3061). После ПЦР V-домены антитела затем могут быть рекомбинированы посредством рекомбинации *in vitro* в плазмиды или фагмиды (Lilley et al., *Journal of Immunological Methods* (1994), Vol. 171, pp. 211-226. Hogrefe et al., *Gene* (1993), Vol. 128, pp. 119-126). Эта технология фагового дисплея основана на слиянии фрагментов антител с минорным белком оболочки фага рIII или его C-концевым доменом (Smith, *Science* (1985), Vol. 228, pp. 1315-1317. Hoogenboom, *Nature Biotechnology* (2005), Vol. 23, pp. 1105-1116). Помимо экспонирования фрагментов scFv фаговый дисплей в настоящее время также широко используется для экспонирования фрагментов Fab (Wieland et al., *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2006), Vol. 110, pp. 129-140).

Фрагменты Fab могут быть получены из моноклональных антител путем ферментативного расщепления с использованием папаина или пепсина. Расщепление антител папаином дает три отдельных фрагмента: два антигенсвязывающих фрагмента, называемых фрагментами или областями Fab, каждый с одним антигенсвязывающим сайтом, и одну область Fc путем расщепления ниже домена CH1 (Porter, *Biochem* (1959), Vol. 73, pp. 119-126). Расщепление антител пепсином дает два фрагмента: фрагмент F(ab')₂, содержащий две антигенсвязывающие области, соединенные дисульфидным мостиком шарнирной области, и фрагмент Fc (Valedkarimi et al., *Human Antibodies* (2018), Vol. 26, pp. 171-176). Эти фрагменты Fab и F(ab')₂ могут быть очищены комбинацией

следующих методик: ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии на белке А или G, аффинной хроматографии с использованием антигена или гель-фильтрационной хроматографии (Mage and Lamoyi. *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker Inc, New York, 1987, pp. 79-97). F(ab')_n или (модифицированный F(ab')_n) может быть получен в сочетании с изобретением, описанным в настоящем документе, и может быть получен с использованием любых подходящих методик ферментативного отщепления и/или расщепления. Согласно определенным вариантам реализации фрагмент антитела может быть получен путем расщепления протеазой IdeS, разрушающим IgG ферментом *Streptococcus pyogenes*, который расщепляет IgG1 человека в определенном сайте ниже шарнира, оставляя интактным фрагмент антитела F(ab')_n, где n представляет собой число доменов антитела, присутствующих на IgG, причем тяжелая цепь на одной стороне F(ab')_n спарена с тяжелой цепью на другой стороне на их соответствующем С-конце, при этом спаривание включает два или более дисульфидных мостиков. Ранее были описаны способы получения биспецифичных и мультиспецифичных антител, где n=2 или более. См. PCT/NL2019/050199; PCT/NL2013/050294; PCT/NL2013/050293, которые включены посредством ссылки.

В качестве альтернативы, фрагмент антитела, лишенный области Fc, может быть получен с использованием цистеиновой протеазы из *Porphyromonas gingivalis*, которая расщепляет IgG1 человека в определенном сайте над шарниром (KSCDK/ТНТСПС) с получением интактных фрагментов Fab и Fc. Фрагмент антитела может быть получен с помощью этой методики посредством экспрессии тяжелой цепи, содержащей переменный домен и константный домен (например, CH1, CH2 и/или CH3), которая соединена с дополнительным переменным доменом линкером, описанным в настоящем документе, или спарена с легкой цепью, которая соединена с дополнительным переменным доменом линкером, описанным в настоящем документе, и при этом протеолитический фермент, например, из *Porphyromonas gingivalis*, расщепляет константные домены указанной тяжелой цепи, оставляя интактный укороченный связывающий фрагмент антитела.

Получение sdAb было достигнуто с помощью фагового дисплея и с использованием репертуаров наивных или синтетических VH или VL dAb, основанных на включении солубилизирующих остатков из sdAb верблюдовых в VH человека (Tanha et al., *J. Biol. Chem* (2001), Vol. 276, pp. 24774-24780. Davies and Riechmann, *Biotechnology* (1995), Vol. 13, pp. 475-479). Человеческие sdAb также были получены без необходимости

конструирования с помощью метода отбора, основанного на критериях обратимого разворачивания и аффинности, что привело к получению ряда VH из синтетических библиотек фагового дисплея VH человека (Jespers et al, Nat. Biotechnol (2004), Vol. 337, pp. 893-903). Другой метод фагового отбора можно использовать для получения
5 исключительно неагрегирующих доменов VH человека из наивной библиотеки дисплея VH человека (To et al., J Biol Chem (2005), Vol. 280, pp. 41395-41403). Эту же методику можно применять для получения VL (Kim et al., Landes Bioscience (2014), Vol. 6:1, pp. 219-235).

10 Антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению можно использовать для лечения рака путем введения эффективного количества антитела или фрагмента антитела субъекту, нуждающемуся в этом.

В настоящем документе термины «субъект» и «пациент» используются взаимозаменяемо и относятся к млекопитающему, такому как человек, мышь, крыса, хомяк, морская свинка, кролик, кошка, собака, обезьяна, корова, лошадь, свинья и т. п.
15 (например, пациент, такой как пациент-человек, имеющий рак).

Термины «лечить», «осуществлять лечение» и «лечение» в контексте настоящего документа относятся к любому типу вмешательства или процессу, выполняемому у субъекта, или введению активного агента или комбинации активных агентов субъекту с целью излечения или улучшения заболевания или его симптома. Это включает обращение
20 вспять, облегчение, уменьшение, ингибирование или замедление симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием, а также предотвращение возникновения, прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием.

25 В настоящем документе термин «эффективное лечение» или «положительный терапевтический ответ» относится к лечению, дающему благоприятный эффект, например, уменьшение по меньшей мере одного симптома заболевания или нарушения, например, рака. Благоприятный эффект может представлять собой улучшение по сравнению с исходным уровнем, включая улучшение по сравнению с измерением или
30 наблюдением, сделанным до начала терапии в соответствии со способом. Например, благоприятный эффект может представлять собой замедление, стабилизацию, остановку или обращение вспять прогрессирования рака у субъекта на любой клинической стадии, что подтверждается уменьшением или устранением клинического или диагностического симптома заболевания или маркера рака. Эффективное лечение может, например,

уменьшать размер опухоли, уменьшать присутствие циркулирующих опухолевых клеток, уменьшать или предотвращать метастазы опухоли, замедлять или останавливать рост опухоли и/или предотвращать или отсрочивать рецидив или повторное появление опухоли.

5 Термин «терапевтическое количество» или «эффективное количество» относится к количеству агента или комбинации агентов, которое обеспечивает целевой биологический, терапевтический и/или профилактический результат. Этот результат может представлять собой снижение, уменьшение, временное облегчение, ослабление, отсрочку и/или облегчение одного или более признаков, симптомов или причин

10 заболевания или любое другое целевое изменение биологической системы. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическое количество представляет собой количество, достаточное для отсрочки развития опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическое количество представляет собой количество, достаточное для предотвращения или отсрочки рецидива опухоли.

15 Терапевтическое количество лекарственного средства или композиции может: (i) уменьшать количество раковых клеток; (ii) уменьшать размер опухоли; (iii) ингибировать, сдерживать, замедлять в некоторой степени и может останавливать инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; (iv) ингибировать метастазирование опухоли; (v) ингибировать рост опухоли; (vi) предотвращать или отсрочивать возникновение и/или

20 рецидив опухоли; и/или (vii) облегчать до некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком.

Терапевтическое количество может варьироваться в зависимости от таких факторов как патологическое состояние, возраст, пол и масса индивидуума, подлежащего лечению, и способности агента или комбинации агентов вызывать целевой ответ у индивидуума.

25 Терапевтическое количество может быть введено с помощью одного или более введений.

Терапевтическое количество также включает количество, которое уравнивает любые токсические или вредные эффекты агента или комбинации агентов и терапевтически благоприятные эффекты.

30 Более конкретно, согласно настоящему изобретению предложено антитело или фрагмент указанного антитела, который специфично связывается с внеклеточным доменом TGF- β RII человека, причем указанное антитело или фрагмент антитела связывается с эпитопом внеклеточного домена TGF- β RII человека, в котором фенилаланин (F) в положении 25 является критично важным остатком для связывания.

В исследованиях, которые привели к настоящему изобретению, были идентифицированы антитела, которые связываются с конкретным эпитопом внеклеточного домена TGF- β RII человека. Этот эпитоп содержит по меньшей мере аминокислотный остаток в положении 25 внеклеточного домена изоформы А TGF- β RII человека. Аминокислотная последовательность внеклеточного домена изоформы А TGF- β RII человека приведена в SEQ ID NO: 102. Аминокислота в положении 25 этой последовательности представляет собой фенилаланин (F) (выделен жирным шрифтом и подчеркнут). Номер доступа в базе данных для белка TGF- β RII человека и гена, кодирующего изоформу А: GenBank NM_001024847.2 (ссылка на последовательность белка: NP_001020018.1; SEQ ID NO:102). Вариант сплайсинга, кодирующий более длинную изоформу из-за вставки во внеклеточный домен, представляет собой изоформу В. Ген, кодирующий изоформу В: GenBank NM_003242.6 (ссылка на последовательность белка: NP_003233.4; SEQ ID NO: 103 с подчеркнутой вставкой). Аминокислота в положении 25 внеклеточного домена изоформы А соответствует аминокислоте в положении 50 внеклеточного домена изоформы В. Аминокислотная последовательность внеклеточного домена изоформы В TGF- β RII человека приведена в SEQ ID NO: 104. Аминокислота фенилаланин (F) в положении 50 этой последовательности выделена жирным шрифтом и подчеркнута. Эти номера доступа приведены главным образом для обеспечения дополнительного метода идентификации белка TGF- β RII в качестве мишени, фактическая последовательность белка TGF- β RII, связанного антителом, может варьироваться, например, из-за мутации в кодирующем гене, такой как те, которые появляются при некоторых видах рака или т.п.

Везде, где это описание относится к аминокислоте в положении 25 TGF- β RII человека, оно относится к аминокислоте в положении 25 внеклеточного домена изоформы А TGF- β RII человека, а также к соответствующему положению другой изоформы TGF- β RII человека, в частности, положению 50 изоформы В. То же самое относится к другим положениям аминокислот, указанным в настоящем документе.

Было обнаружено, что аминокислотный остаток в положении 25 внеклеточного домена TGF- β RII человека является критично важным остатком для связывания антител согласно настоящему изобретению, как определено с помощью сканирования аланином. При сканировании аланином аминокислоты в каждом положении антигена, в данном случае TGF- β RII, заменяют одна за другой аланином. Если это снижает или значительно уменьшает связывание антитела, которое связывает немодифицированный антиген, следовательно, заменяемая аминокислота участвует в связывании и считается критично

важным остатком. Таким образом, антитело или фрагмент антитела специфично связывает эпитоп, содержащий такой остаток. В данном контексте аминокислотный остаток считается критично важным остатком, если его активность или реактивность связывания снижена более чем на 50% по сравнению с немодифицированной аминокислотной последовательностью. Таким образом, «значительно сниженный» означает активность или реактивность связывания, которая снижена по меньшей мере более чем на 50% по сравнению с немодифицированной аминокислотной последовательностью внеклеточного домена TGF β RII человека.

Соответственно, антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению имеет активность или реактивность связывания менее 50%, предпочтительно менее 40%, 30%, 20%, 10%, 5% или 2%, когда фенилаланин (F) в положении 25 аминокислотной последовательности внеклеточного домена TGF β RII человека, последовательность дикого типа которого приведена в SEQ ID No.102, заменен аланином (A) по сравнению с аминокислотной последовательностью дикого типа внеклеточного домена TGF β RII человека.

Таким образом, антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению специфично связывается с эпитопом TGF- β RII человека, содержащим фенилаланин (F) в положении 25 аминокислотной последовательности внеклеточного домена TGF- β RII человека. Предпочтительно связывание антитела или фрагмента антитела с этим эпитопом определяют с помощью сканирования аланином, причем антитело или фрагмент антитела, который связывается с этим эпитопом, имеет активность или реактивность связывания менее 50%, предпочтительно менее 40%, 30%, 20%, 10%, 5% или 2%, когда аланин (A) присутствует в положении 25 аминокислотной последовательности внеклеточного домена TGF- β RII человека, по сравнению с тем, когда в указанном положении присутствует фенилаланин (F).

Другой способ определения антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению состоит в том, что оно(он) связывается с эпитопом внеклеточного домена TGF β RII человека, в котором замена аланином (A) остатка фенилаланина (F), который находится в положении 25 в изоформе A TGF β RII человека, последовательность дикого типа которой приведена в SEQ ID No.102, уменьшает связывание антитела или фрагмента антитела по меньшей мере на 50%, предпочтительно по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 98%.

Антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению также можно определить как антитело или фрагмент антитела, который связывается с эпитопом во

внеклеточном домене TGF- β RII человека, причем указанный эпитоп содержит остаток фенилаланина (F), который в изоформе A TGF- β RII человека, последовательность дикого типа которой приведена в SEQ ID No.102, находится в положении 25. Помимо критично важного аминокислотного остатка в положении 25 аспартат (D) в положении 119 эпитопа

5 внеклеточного домена изоформы A TGF- β RII человека был идентифицирован как еще один критично важный остаток для связывания. Аминокислота в положении 119 изоформы A соответствует аминокислоте в положении 144 внеклеточного домена изоформы B TGF- β RII человека (SEQ ID NO: 104). Антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно имеет реактивность связывания

10 менее 10%, более предпочтительно менее 5%, 4%, 3% или 2%, когда аспартат (D) в положении 119 аминокислотной последовательности дикого типа внеклеточного домена TGF- β RII человека заменен аланином (A) по сравнению с аминокислотной последовательностью дикого типа внеклеточного домена TGF- β RII человека.

Согласно конкретному варианту реализации антитело или фрагмент антитела

15 предпочтительно имеет:

- реактивность связывания менее 5%, предпочтительно менее 3%, когда фенилаланин (F) в положении 25 аминокислотной последовательности дикого типа внеклеточного домена TGF- β RII человека заменен аланином (A);
 - реактивность связывания менее 5%, предпочтительно менее 3%, когда аспартат
- 20 (D) в положении 119 аминокислотной последовательности дикого типа внеклеточного домена TGF- β RII человека заменен аланином (A), по сравнению с аминокислотной последовательностью дикого типа внеклеточного домена TGF β RII человека.

Таким образом, настоящее изобретение охватывает антитело или фрагмент антитела, который специфично связывается с эпитопом TGF- β RII человека, содержащим

25 фенилаланин (F) в положении 25 и аспартат (D) в положении 119 аминокислотной последовательности внеклеточного домена TGF- β RII человека. Предпочтительно связывание антитела или фрагмента антитела с этим эпитопом определяют с помощью сканирования аланином, причем антитело или фрагмент антитела, который связывается с этим эпитопом, имеет активность или реактивность связывания менее 50%,

30 предпочтительно менее 5% или 3%, когда аланин присутствует в положении 25 аминокислотной последовательности внеклеточного домена TGF- β RII человека, и активность или реактивность связывания менее 10%, предпочтительно менее 5% или 3%, когда аланин (A) присутствует в положении 119 аминокислотной последовательности внеклеточного домена TGF- β RII человека, по сравнению с тем, когда фенилаланин (F) и

аспаратат (D) присутствуют в указанных соответствующих положениях, при этом каждое изменение тестируется по отдельности, а не как комбинация двух изменений по сравнению с внеклеточным доменом дикого типа.

5 Другой способ определения антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению заключается в том, что оно(он) связывается с эпитопом внеклеточного домена TGFβRII человека, в котором:

10 - замена аланином (A) остатка фенилаланина (F), который в изоформе A TGFβRII человека, последовательность дикого типа которой приведена в SEQ ID No.102, находится в положении 25, уменьшает связывание антитела или фрагмента антитела по меньшей мере на 50%, предпочтительно по меньшей мере на 95% или 97%; и

- замена аланином (A) остатка аспартата (D), который в изоформе A TGFβRII человека, последовательность дикого типа которой приведена в SEQ ID No.102, находится в положении 119, уменьшает связывание антитела или фрагмента антитела по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95% или 97%.

15 Антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению также можно определить как антитело или фрагмент антитела, который связывается с эпитопом во внеклеточном домене TGF-βRII человека, причем указанный эпитоп содержит остаток фенилаланина (F) и остаток аспартата (D), которые в изоформе A TGF-βRII человека, последовательность дикого типа которой приведена в SEQ ID No.102, находятся в
20 положениях 25 и 119, соответственно.

Согласно другому варианту реализации антитело или фрагмент антитела связывается с эпитопом внеклеточного домена TGF-βRII человека, в котором треонин (T) в положении 52 эпитопа внеклеточного домена изоформы A TGF-βRII человека является другим критично важным остатком для связывания. Аминокислота в положении 52 изоформы A
25 соответствует аминокислоте в положении 77 изоформы B TGF-βRII человека. Согласно этому варианту реализации антитело или фрагмент антитела предпочтительно имеет:

- реактивность связывания менее 5%, предпочтительно менее 2%, когда фенилаланин (F) в положении 25 аминокислотной последовательности дикого типа внеклеточного домена TGF-βRII человека заменен аланином (A);

30 - реактивность связывания менее 60%, предпочтительно менее 40% или 30%, более предпочтительно менее 20%, когда треонин (T) в положении 52 аминокислотной последовательности дикого типа внеклеточного домена TGF-βRII человека заменен аланином (A); и

- реактивность связывания менее 3%, когда аспаргат (D) в положении 119 аминокислотной последовательности дикого типа внеклеточного домена TGF- β RII человека заменен аланином (A),

5 по сравнению с аминокислотной последовательностью дикого типа внеклеточного домена TGF- β RII человека.

Таким образом, настоящее изобретение охватывает антитело или фрагмент антитела, который специфично связывается с эпитопом TGF- β RII человека, содержащим фенилаланин (F) в положении 25, треонин (T) в положении 52 и аспаргат (D) в положении 119 аминокислотной последовательности внеклеточного домена TGF- β RII человека.

10 Предпочтительно связывание антитела или фрагмента антитела с этим эпитопом определяют с помощью сканирования аланином, причем антитело или фрагмент антитела, который связывается с этим эпитопом, имеет активность или реактивность связывания менее 50%, предпочтительно менее 5% или 2%, когда аланин (A) присутствует в положении 25 аминокислотной последовательности внеклеточного домена TGF- β RII человека, активность или реактивность связывания менее 60%, предпочтительно менее 40%, 30% или 20%, когда аланин (A) присутствует в положении 52 аминокислотной последовательности внеклеточного домена TGF- β RII человека, и активность или реактивность связывания менее 10%, предпочтительно менее 3%, когда аланин (A) присутствует в положении 119 аминокислотной последовательности внеклеточного домена TGF- β RII человека, по сравнению с тем, когда фенилаланин (F), треонин (T) и аспаргат (D) присутствуют в указанных соответствующих положениях, при этом каждое изменение тестируется по отдельности, а не как комбинация двух изменений по сравнению с внеклеточным доменом дикого типа.

25 Другой способ определения антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению заключается в том, что оно(он) связывается с эпитопом внеклеточного домена TGF β RII человека, в котором:

- замена аланином (A) остатка фенилаланина (F), который в изоформе A TGF β RII человека, последовательность дикого типа которой приведена в SEQ ID No.102, находится в положении 25, уменьшает связывание антитела или фрагмента антитела по меньшей мере на 50%, предпочтительно по меньшей мере на 95% или 98%;

30 - замена аланином (A) остатка треонина (T), который в изоформе A TGF β RII человека, последовательность дикого типа которой приведена в SEQ ID No.102, находится в положении 52, уменьшает связывание антитела или фрагмента антитела по меньшей мере на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 70% или 80%; и

- замена аланином (A) остатка аспартата (D), который в изоформе A TGF β RII человека, последовательность дикого типа которой приведена в SEQ ID No.102, находится в положении 119, уменьшает связывание антитела или фрагмента антитела по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 97%.

5 Антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению также можно определить как антитело или фрагмент антитела, который связывается с эпитопом во внеклеточном домене TGF- β RII человека, причем указанный эпитоп содержит остаток фенилаланина (F), остаток треонина (T) и остаток аспартата (D), которые в изоформе A TGF- β RII человека, последовательность дикого типа которой приведена в SEQ ID No.102, находятся в положениях 25, 52 и 119, соответственно.

10 Согласно другому варианту реализации антитело или фрагмент антитела связывается с эпитопом внеклеточного домена TGF- β RII человека, в котором изолейцин (I) в положении 54 и глутамат (E) в положении 120 эпитопа внеклеточного домена изоформы A TGF- β RII человека являются другими критично важными остатками для связывания.

15 Аминокислоты в положениях 54 и 120 изоформы A соответствуют аминокислотам в положениях 79 и 145, соответственно, изоформы B TGF- β RII человека. Согласно этому варианту реализации антитело или фрагмент антитела предпочтительно имеет:

- реактивность связывания менее 10%, когда фенилаланин (F) в положении 25 аминокислотной последовательности дикого типа внеклеточного домена TGF- β RII человека заменен аланином (A);

- реактивность связывания менее 20%, когда изолейцин (I) в положении 54 аминокислотной последовательности дикого типа внеклеточного домена TGF- β RII человека заменен аланином (A);

25 - реактивность связывания менее 3%, предпочтительно менее 2%, более предпочтительно менее 1%, когда аспартат (D) в положении 119 аминокислотной последовательности дикого типа внеклеточного домена TGF- β RII человека заменен аланином (A); и

30 - реактивность связывания менее 80%, предпочтительно менее 70%, 60%, 50%, 40%, более предпочтительно менее 30%, наиболее предпочтительно менее 10% или 5%, когда глутамат (E) в положении 120 аминокислотной последовательности дикого типа внеклеточного домена TGF- β RII человека заменен аланином (A),

по сравнению с аминокислотной последовательностью дикого типа внеклеточного домена TGF- β RII человека.

Таким образом, настоящее изобретение охватывает антитело или фрагмент антитела, который специфично связывается с эпитопом TGF- β RII человека, содержащим фенилаланин (F) в положении 25, изолейцин (I) в положении 54, аспартат (D) в положении 119 и глутамат (E) в положении 120 аминокислотной последовательности внеклеточного домена TGF- β RII человека. Предпочтительно связывание антитела или фрагмента антитела с этим эпитопом определяют с помощью сканирования аланином, причем антитело или фрагмент антитела, который связывается с этим эпитопом, имеет активность или реактивность связывания менее 50%, предпочтительно менее 10%, когда аланин (A) присутствует в положении 25 аминокислотной последовательности внеклеточного домена TGF- β RII человека, активность или реактивность связывания менее 20%, когда аланин (A) присутствует в положении 54 аминокислотной последовательности внеклеточного домена TGF- β RII человека, активность или реактивность связывания менее 10%, предпочтительно менее 3%, 2% или 1%, когда аланин (A) присутствует в положении 119 аминокислотной последовательности внеклеточного домена TGF- β RII человека, и активность или реактивность связывания менее 80%, предпочтительно менее 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 10% или 5%, когда аланин (A) присутствует в положении 120 аминокислотной последовательности внеклеточного домена TGF- β RII человека по сравнению с тем, когда фенилаланин (F), треонин (T), аспартат (D) и глутамат (E) присутствуют в указанных соответствующих положениях, при этом каждое изменение тестируется по отдельности, а не как комбинация двух изменений по сравнению с внеклеточным доменом дикого типа.

Другой способ определения антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению заключается в том, что оно(он) связывается с эпитопом внеклеточного домена TGF β RII человека, в котором

- замена аланином (A) остатка фенилаланина (F), который в изоформе A TGF β RII человека, последовательность дикого типа которой приведена в SEQ ID No.102, находится в положении 25, уменьшает связывание антитела или фрагмента антитела по меньшей мере на 50%, предпочтительно по меньшей мере на 90%;

- замена аланином (A) остатка изолейцина (I), который в изоформе A TGF β RII человека, последовательность дикого типа которой приведена в SEQ ID No.102, находится в положении 54, уменьшает связывание антитела или фрагмента антитела по меньшей мере на 80%;

- замена аланином (A) остатка аспартата (D), который в изоформе A TGF β RII человека, последовательность дикого типа которой приведена в SEQ ID No.102, находится

в положении 119, уменьшает связывание антитела или фрагмента антитела по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 97%, 98% или 99%; и

5 - замена аланином (A) остатка глутамата (E), который в изоформе A TGF β RII человека, последовательность дикого типа которой приведена в SEQ ID No. 102, находится в положении 120, уменьшает связывание антитела или фрагмента антитела по меньшей мере на 30%, предпочтительно по меньшей мере на 40%, 50%, 60%, 70%, 90% или 95%.

10 Антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению также можно определить как антитело или фрагмент антитела, который связывается с эпитопом во внеклеточном домене TGF- β RII человека, причем указанный эпитоп содержит остаток фенилаланина (F), остаток изолейцина (I), остаток аспартата (D) и остаток глутамата (E), которые в изоформе A TGF- β RII человека, последовательность дикого типа которой приведена в SEQ ID No.102, находятся в положениях 25, 54, 119 и 120, соответственно.

15 Авторы настоящего изобретения идентифицировали ряд антител, которые содержат переменную область тяжелой цепи, которая специфично связывается с эпитопом внеклеточного TGF- β RII, в котором фенилаланин (F) в положении 25 является критично важным для связывания. Один пример такого антитела содержит переменную область тяжелой цепи (VH), имеющую:

20 (a) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 1,

(b) VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 2, и

(c) VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 3,

25 причем от одного до пяти аминокислотных остатков могут быть изменены с использованием консервативной(ых) в отношении них аминокислоты(аминокислот) в любом одном или более из CDR, выбранных из VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3. Это антитело включено в объем настоящего изобретения.

30 Другой пример такого антитела содержит переменную область тяжелой цепи (VH), имеющую:

(a) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 4,

(b) VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 5, и

(с) VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 6,

5 причём от одного до пяти аминокислотных остатков могут быть изменены с использованием консервативной(ых) в отношении них аминокислоты(аминокислот) в любом одном или более из CDR, выбранных из VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3. Это антитело также включено в объём настоящего изобретения.

Другой пример такого антитела содержит переменную область тяжелой цепи (VH), имеющую:

10 (а) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 7,

(б) VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 8, и

(с) VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 9,

15 причём от одного до пяти аминокислотных остатков могут быть изменены с использованием консервативной(ых) в отношении них аминокислоты(аминокислот) в любом одном или более из CDR, выбранных из VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3. Это антитело также включено в объём настоящего изобретения.

20 Таким образом, переменная область тяжелой цепи антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению может содержать CDR1, выбранный из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 1, 4 и 7; CDR2, выбранный из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 2, 5 и 8; и/или CDR3, выбранный из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 3, 6 и 9; причём от одного до пяти аминокислотных остатков
25 могут быть изменены с использованием консервативной(ых) в отношении них аминокислоты(аминокислот) в любом одном или более из CDR, выбранных из CDR1, CDR2 и CDR3.

30 Каркасные участки переменной области тяжелой цепи могут быть выбраны из любых подходящих каркасных участков. Примерами подходящих каркасных участков являются каркасные участки, кодируемые V-генами человека IGHV3-15 и IGHV3-23. Эти V-гены зародышевой линии могут содержать одну или более соматических мутаций.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело или фрагмент указанного антитела содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDIYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTT
 YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGQYRDIVGATDYWGQG
 TLVTVSS (SEQ ID NO: 10), или аминокислотную последовательность VH, имеющую по
 меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по
 5 меньшей мере 95% идентичности с ней.

Согласно другому варианту реализации антитело или фрагмент указанного антитела
 содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность:
 QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTISGG
 ATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRDYWGQGTTLVTVSS
 10 (SEQ ID NO: 11), или аминокислотную последовательность VH, имеющую по меньшей
 мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей
 мере 95% идентичности с ней.

Согласно другому варианту реализации антитело или фрагмент указанного антитела
 содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность:
 15 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
 HNTDSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIAASGKNYFDPWGQGT
 LTVTVSS (SEQ ID NO: 12), или аминокислотную последовательность VH, имеющую по
 меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по
 меньшей мере 95% идентичности с ней.

20 Вариабельная область тяжелой цепи может иметь 0-10, предпочтительно 0-5
 аминокислотных вариаций по отношению к указанной аминокислотной
 последовательности. Согласно предпочтительному варианту реализации вариабельная
 область тяжелой цепи содержит 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4, предпочтительно 0-3,
 предпочтительно 0-2, предпочтительно 0-1 и более предпочтительно 0 аминокислотных
 25 вариаций, вставок, делеций, замен, добавлений по отношению к указанной
 аминокислотной последовательности или их комбинацию в положениях, отличных от
 CDR. Комбинация вставки, добавления, делеции или замены представляет собой
 комбинацию, если выравненные последовательности не различаются более чем в 10,
 предпочтительно не более чем в 5 положениях. Пропуск в одной из выравненных
 30 последовательностей учитывает столько же аминокислот, сколько пропущено в другой
 последовательности. Аминокислотная замена, если таковая имеется, предпочтительно
 представляет собой консервативную аминокислотную замену. Замены в вариабельной
 области тяжелой цепи могут являться дополнительными к заменам в одном или более
 CDR, как описано выше. Консервативные аминокислоты известны в данной области

техники на основании сходства соответствующих функциональных групп на основании таких характеристик как заряд, гидрофобность, гидрофильность, кислотность, основность и размер.

5 Аминокислотную вариацию, вставку, делецию, замену, добавление или их комбинацию предпочтительно не выполняют на связывающей поверхности тяжелой и легкой цепи.

10 Если аминокислоту изменяют на поверхности взаимодействия Н/Л цепи, предпочтительно, чтобы соответствующие аминокислоты в другой цепи были изменены, чтобы приспособиться к этому изменению. Вставка или добавление аминокислоты предпочтительно не влечет за собой вставку или добавление пролина.

15 Настоящее изобретение охватывает антитела или фрагменты антител, содержащие вариант антитела или фрагмента антитела, описанного в настоящем документе. В частности, антитело или фрагмент антитела, содержащий VH, имеющую любую из SEQ ID NO: 22-91 и 93, то есть любую из последовательностей VH, показанных на Фигуре 4.

20 Также включены антитела или фрагменты антител, содержащие по меньшей мере HCDR3 или все CDR любой из SEQ ID NO: 22-91 и 93. Предпочтительные антитела или фрагменты антител содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую или полученную из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 40; 43; 46; 47; 48 или 54, которые представляют собой варианты антител, содержащих

25 переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11. Другие предпочтительные антитела или фрагменты антител содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую или полученную из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 67; 70; 75; 76; 77; 78; 83; 84; или 88, которые представляют собой варианты антител, содержащих переменную

30 область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12. Другие предпочтительные антитела или фрагменты антител содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую или полученную из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 24 или 26, которые представляют собой варианты антител, содержащих переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10. Наиболее предпочтительными вариантами являются варианты, содержащие переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40; 43; 46; 47; 48; 54; 67; 70; 75; 76; 77; 78; 83; 84; или 88.

Вариабельная область тяжелой цепи такого варианта может иметь 0-10, предпочтительно 0-5 аминокислотных вариаций по отношению к указанной аминокислотной последовательности. Согласно предпочтительному варианту реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4, предпочтительно 5 0-3, предпочтительно 0-2, предпочтительно 0-1 и более предпочтительно 0 аминокислотных вариаций, вставок, делеций, замен, добавлений по отношению к указанной аминокислотной последовательности или их комбинацию в положениях, отличных от CDR.

Антитело или фрагмент антитела или связывающий домен согласно настоящему 10 изобретению может содержать любую подходящую легкую цепь, такую как, например, когнатная легкая цепь или общая легкая цепь, как определено в настоящем документе.

Согласно одному варианту реализации вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность генного сегмента IgV κ 1-39*01, как показано на Фигуре 1B, с 0-10, предпочтительно 0-5 аминокислотными вариациями, вставками, 15 делециями, заменами, добавлениями или их комбинацией. IgV κ 1-39 представляет собой сокращение для гена вариабельной каппа-цепи иммуноглобулина 1-39. Ген также известен как ген вариабельной каппа цепи иммуноглобулина 1-39; IGKV139; IGKV1-39. Внешние идентификаторы гена включают HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. Предпочтительная аминокислотная последовательность для IgV κ 1-39 20 представлена на Фигуре 1A. Указана последовательность V-области. V-область можно комбинировать с одной из пяти J-областей. На Фигурах 1B и 1C описаны две предпочтительные последовательности для IgV κ 1-39 в комбинации с J-областью. Соединенные последовательности обозначены как IGKV1-39/jk1 и IGKV1-39/jk5; альтернативные названия: IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 или IgV κ 1-39*01/IGJ κ 5*01 25 (номенклатура в соответствии с базой данных IMGT в Интернете по адресу imgt.org).

Предпочтительно IgV κ 1-39*01-содержащая вариабельная область легкой цепи представляет собой последовательность зародышевой линии. Кроме того, предпочтительно вариабельная область легкой цепи, содержащая IGJ κ 1*01 или IGJ κ 5*01, 30 представляет собой последовательность зародышевой линии. Кроме того, предпочтительно вариабельные области легкой цепи IGKV1-39/jk1 или IGKV1-39/jk5 представляют собой последовательности зародышевой линии.

Зрелые В-клетки, продуцирующие антитело с легкой цепью, часто продуцируют легкую цепь, которая претерпела одну или более мутаций по отношению к последовательности зародышевой линии, что означает нормальную последовательность в

нелимфоидных клетках организма. Процесс, ответственный за эти мутации, называется соматической гипермутацией. Полученная легкая цепь называется легкой цепью с созревшей аффинностью. Такие легкие цепи, когда они получены из последовательности зародышевой линии IgV κ 1-39*01, представляют собой легкие цепи, полученные из IgV κ 1-39*01. В данном описании выражение «IgV κ 1-39*01» будет включать легкие цепи, полученные из IgV κ 1-39*01. Мутации, которые вводятся в нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь, путем соматической гипермутации, также могут быть введены искусственно в лаборатории. В лаборатории в легкую цепь также могут быть введены другие вариации, не влияющие на свойства легкой цепи по существу, не обязательно по количеству. Легкая цепь представляет собой по меньшей мере легкую цепь IgV κ 1-39*01, если она содержит последовательность, изображенную на Фигуре 1А, Фигуре 1В или Фигуре 1С, с 0-10, предпочтительно 0-5 аминокислотными вариациями, вставками, делециями, заменами, добавлениями или их комбинацией. Предпочтительно легкая цепь IgV κ 1-39*01 представляет собой легкую цепь, содержащую последовательность, изображенную на Фигуре 1А, Фигуре 1В или Фигуре 1С, с 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4 аминокислотными вариациями, вставками, делециями, заменами, добавлениями или их комбинацией, более предпочтительно последовательность, изображенную на Фигуре 1А, Фигуре 1В или Фигуре 1С, с 0-5, предпочтительно 0-4, 0-3, 0-2, 0-1 аминокислотными вариациями, вставками, делециями, заменами, добавлениями или их комбинацией, еще более предпочтительно последовательность, изображенную на Фигуре 1А, Фигуре 1В или Фигуре 1С, с 0-3 аминокислотными вариациями, вставками, делециями, заменами, добавлениями или их комбинацией, еще более предпочтительно последовательность, изображенную на Фигуре 1А, Фигуре 1В или Фигуре 1С, с 0-2 аминокислотными вариациями, вставками, делециями, заменами, добавлениями или их комбинацией, еще более предпочтительно последовательность, изображенную на Фигуре 1А, Фигуре 1В или Фигуре 1С, с 0-1 аминокислотными вариациями, вставками, делециями, заменами, добавлениями или их комбинацией, и наиболее предпочтительно 0 аминокислотных вариаций, вставок, делеций, замен, добавлений или их комбинацией.

Согласно одному варианту реализации антитела или фрагмент указанного антитела, или связывающий домен содержит переменную область легкой цепи (VL), имеющую:

(a) VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 19,

(b) VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 20, и

(с) VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 21,

причем от одного до пяти аминокислотных остатков могут быть заменены консервативной(ыми) в отношении них аминокислотой(ами) в любом одном или более из CDR, выбранных из VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3.

Вариабельная область легкой цепи антитела или фрагмента антитела, или связывающего домена согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит участок CDR1, CDR2 и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность CDR1 – QSISSY (SEQ ID NO: 13), CDR2 – AAS (SEQ ID NO: 14), CDR3 – QQSYSTPPT (SEQ ID NO: 15), т.е. CDR из IGKV1-39 (согласно IMGT), допускающие 0-5 аминокислотных замен относительно указанной аминокислотной последовательности. В соответствии с нумерацией Kabat аминокислотные последовательности представляют собой: CDR1 – RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 19), CDR2 – AASSLQS (SEQ ID NO: 20), CDR3 – QQSYSTPPT (SEQ ID NO: 21). Любые аминокислотные вариации, вставки, делеции, замены, добавления или их комбинация предпочтительно не находятся в участке CDR3

вариабельной области легкой цепи, предпочтительно не находятся в участке CDR1 или CDR2 вариабельной области легкой цепи. Аминокислотная замена предпочтительно представляет собой консервативную аминокислотную замену.

В частности, вариабельная область легкой цепи антитела или фрагмента антитела, или связывающего домена согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGKVEIK (SEQ ID NO: 16) или аминокислотную последовательность VL, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с ней. Таким образом, это допускает 0-5 аминокислотных вариаций, вставок, делеций, замен, добавлений или их комбинацию. Аминокислотная замена предпочтительно представляет собой консервативную аминокислотную замену.

Антитело согласно настоящему изобретению может быть любого изотипа: IgA, IgM, IgG, IgD или IgE. Предпочтительно антитело представляет собой IgG, в частности, IgG1 или IgG4. Наиболее предпочтительно антитело представляет собой IgG1.

Константная область антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой константную область человека, но может принадлежать любому животному. Она может представлять собой константную область мыши или крысы. Предпочтительно можно использовать константную область мыши или константную

	NO: 105	NO: 106	NO: 107	NO: 19	NO: 20	NO: 21
5	SEQ ID NO: 108	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
6	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 112	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
7	SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 115	SEQ ID NO: 116	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
8	SEQ ID NO: 117	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 119	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
9	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
10	SEQ ID NO: 123	SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO: 125	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
11	SEQ ID NO: 126	SEQ ID NO: 127	SEQ ID NO: 128	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
12	SEQ ID NO: 129	SEQ ID NO: 130	SEQ ID NO: 131	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
13	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 133	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21

Таблица 1. Возможные комбинации CDR варибельной области тяжелой цепи и CDR варибельной области легкой цепи.

Предпочтительное антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению содержит тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 11, 12, 22-91 и 93, в частности, предпочтительную VH, описанную в настоящем документе, и легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16. Это антитело или фрагмент антитела может содержать любой константный домен, описанный в настоящем документе.

Согласно одному варианту реализации антитело или фрагмент указанного антитела, описанный в настоящем документе, содержит тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 10, и легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16.

имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16.

5 Согласно другому варианту реализации антитело или фрагмент указанного антитела, описанный в настоящем документе, содержит тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 40, и легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16.

10 Согласно другому варианту реализации антитело или фрагмент указанного антитела, описанный в настоящем документе, содержит тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 83, и легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16.

15 Согласно другому варианту реализации антитело или фрагмент указанного антитела, описанный в настоящем документе, содержит тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 78, и легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16.

20 Согласно другому варианту реализации антитело или фрагмент указанного антитела, описанный в настоящем документе, содержит тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 47, и легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16.

25 Согласно другому варианту реализации антитело или фрагмент указанного антитела, описанный в настоящем документе, содержит тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 76, и легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16.

30 Согласно одному варианту реализации антитело или фрагмент указанного антитела, описанный в настоящем документе, содержит две переменные области тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 10, и две переменные области легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 16.

Согласно другому варианту реализации антитело или фрагмент указанного антитела, описанный в настоящем документе, содержит две переменные области тяжелой цепи

Согласно одному варианту реализации антитело или фрагмент указанного антитела, описанный в настоящем документе, содержит две переменные области тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 78, и две переменные области легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 16.

5 Согласно одному варианту реализации антитело или фрагмент указанного антитела, описанный в настоящем документе, содержит две переменные области тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 47, и две переменные области легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 16.

10 Согласно одному варианту реализации антитело или фрагмент указанного антитела, описанный в настоящем документе, содержит две переменные области тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 76, и две переменные области легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 16.

Согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению содержит:

15 (A) тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 10, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 17; и

(B) легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16, и константную область легкой цепи, содержащую
20 аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 18.

Согласно другому варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению содержит:

(A) тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 11, и константную область тяжелой цепи,
25 содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 17; и

(B) легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 18.

30 Согласно другому варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению содержит:

(A) тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 12, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 17; и

(B) легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 18.

5 Согласно одному варианту реализации антитела согласно настоящему изобретению содержит:

(A) тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 43, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 17; и

10 (B) легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 18.

Согласно одному варианту реализации антитела согласно настоящему изобретению содержит:

15 (A) тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 75, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 17; и

(B) легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 18.

20 Согласно одному варианту реализации антитела согласно настоящему изобретению содержит:

(A) тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 70, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 17; и

25 (B) легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 18.

Согласно одному варианту реализации антитела согласно настоящему изобретению содержит:

30 (A) тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 84, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 17; и

(B) легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 18.

5 Согласно одному варианту реализации антитела согласно настоящему изобретению содержит:

(A) тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 88, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 17; и

10 (B) легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 18.

Согласно одному варианту реализации антитела согласно настоящему изобретению содержит:

15 (A) тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 40, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 17; и

(B) легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 18.

20 Согласно одному варианту реализации антитела согласно настоящему изобретению содержит:

(A) тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 83, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 17; и

25 (B) легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 18.

Согласно одному варианту реализации антитела согласно настоящему изобретению содержит:

30 (A) тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 78, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 17; и

(B) легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 18.

5 Согласно одному варианту реализации антитела согласно настоящему изобретению содержит:

(A) тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 47, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 17; и

10 (B) легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 18.

Согласно одному варианту реализации антитела согласно настоящему изобретению содержит:

15 (A) тяжелую цепь, имеющую VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 76, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 17; и

(B) легкую цепь, имеющую VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 16, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 18.

20 Согласно настоящему изобретению также предложен связывающий домен, который специфично связывается с TGF- β RII человека, причем указанный связывающий домен содержит:

любую из переменных областей тяжелой цепи (VH), выбранную из:

25 (A) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 12;

(B) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 26;

(C) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 30;

30 (D) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 40;

(E) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 61;

(F) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 65;

(G) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 70;

5 (H) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 76;

(I) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85; и

10 (J) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 86;

причем от одного до пяти аминокислотных остатков могут быть заменены консервативной(ыми) в отношении них аминокислотой(ами) в любом одном или более из CDR, выбранных из VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3.

15 Последовательности VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в перечне последовательностей, приведенном в настоящем документе.

Согласно одному варианту реализации связывающий домен согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность VH, выбранную из SEQ ID NO: 12, 26, 30, 40, 61, 65, 70, 76, 85 и 86, или аминокислотную последовательность VH, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с ней.

20 Было показано, что связывающие домены согласно настоящему изобретению можно применять в одновалентной и поливалентной форме, что обеспечивает ряд приложений в одновалентных молекулах или двухвалентных молекулах, или в виде одного или более связывающих доменов, включенных в мультиспецифичную молекулу. Указанные связывающие домены в одновалентной форме обладают лучшей способностью
25 блокировать TGF- β RII по сравнению с одновалентным контрольным антителом, что делает их подходящими для упомянутых выше приложений.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложено антитело, предпочтительно мультиспецифичное антитело, содержащее связывающий домен согласно настоящему изобретению в одновалентной форме, причем указанное
30 антитело обладает сравнимой активностью блокирования рецептора в эквимоллярных концентрациях по сравнению с двухвалентным моносспецифичным контрольным антителом, предпочтительно при измерении в одном и том же анализе. Согласно определенным вариантам реализации контрольное антитело содержит две переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, приведенную в

SEQ ID NO: 97, и две переменные области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 135. Согласно определенным вариантам реализации анализ представляет собой репортерный анализ TGF β , предпочтительно репортерный анализ TGF β , описанный в Примере 5. Согласно определенным вариантам реализации сравнимая активность блокирования рецептора включает 5-2-кратное, предпочтительно 3-кратное отклонение от активности блокирования рецептора контрольного антитела.

Антитела и связывающие домены, описанные и заявленные в настоящем документе, такие как, например, те, которые описаны в приведенных выше вариантах реализации, предпочтительно представляют собой выделенные антитела или связывающие домены. Предпочтительно они представляют собой моноклональные антитела. Более предпочтительно они представляют собой выделенные моноклональные антитела.

Антитело или фрагмент антитела, или связывающий домен согласно настоящему изобретению препятствует связыванию лигандов TGF- β 1, TGF- β 2 и/или TGF- β 3 с TGF- β RII. Термин «препятствует связыванию» означает, что антитело или фрагмент антитела направлен на эпитоп на TGF- β RII и конкурирует с TGF- β 1, TGF- β 2 и/или TGF- β 3 за связывание с TGF- β RII. Антитело или фрагмент антитела, или связывающий домен может уменьшать связывание лиганда, вытеснять связывание лиганда, когда он уже связан с TGF- β RII, или может, например, из-за стерических затруднений, по меньшей мере частично предотвращать связывание лиганда с TGF- β RII, и/или препятствовать или предотвращать образование комплекса TGF- β RI-TGF- β RII. Антитело или фрагмент антитела, или связывающий домен может уменьшать образование комплекса TGF- β RI и TGF- β RII, вытеснять такой комплекс, когда комплекс уже образован, или может, например, за счет стерических затруднений, по меньшей мере частично предотвращать образование комплекса TGF- β RI с TGF- β RII. Термин «препятствует связыванию» также означает, что антитело или фрагмент антитела, или связывающий домен согласно настоящему изобретению блокирует связывание лигандов TGF- β 1, TGF- β 2 и/или TGF- β 3 с TGF- β RII.

Согласно настоящему изобретению также предложен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, кодирующий любую из тяжелой цепи и легкой цепи или обе указанные цепи антитела или фрагмента антитела, либо связывающий домен, описанный в настоящем документе. Примеры векторов включают плазмиды, фагмиды, космиды, вирусы и фаговые нуклеиновые кислоты или другие молекулы нуклеиновых кислот, которые способны реплицироваться в прокариотической или эукариотической клетке-

хозяине, например, в клетке млекопитающего. Вектор может представлять собой вектор экспрессии, в котором полинуклеотид, кодирующий любую из тяжелой цепи и легкой цепи или обе указанные цепи антитела или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению, функционально связан с элементами контроля экспрессии. Типичные векторы экспрессии содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, пригодные для регуляции экспрессии полинуклеотидов.

В данной области техники существуют различные способы получения антител. Антитела обычно продуцируются клеткой, которая экспрессирует нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело. Таким образом, согласно настоящему изобретению также предложена выделенная клетка или клетка в культуре ткани, которая продуцирует и/или содержит антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению. Обычно она представляет собой *in vitro*, выделенную или рекомбинантную клетку. Такая клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению. Клетка предпочтительно представляет собой клетку животного, более предпочтительно клетку млекопитающего, более предпочтительно клетку примата, наиболее предпочтительно клетку человека. Для целей настоящего изобретения подходящая клетка представляет собой любую клетку, способную содержать и предпочтительно продуцировать антитело в соответствии с настоящим изобретением и/или содержащую нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно клетка представляет собой клетку гибридомы, клетку яичника китайского хомяка (CHO), клетку NS0 или клетку PER.C6. Особенно предпочтительно клетка представляет собой клетку CHO.

Также предложена клеточная культура или клеточная линия, содержащая клетку в соответствии с настоящим изобретением. Клеточные линии, разработанные для получения белков и антител в промышленных масштабах, далее называются в настоящем документе промышленными линиями клеток.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения антитела или фрагмента антитела, или связывающего домена согласно настоящему изобретению, причем указанный способ включает культивирование клетки согласно настоящему изобретению и сбор антитела или фрагмента антитела, или связывающего домена из указанной культуры. Указанную клетку можно культивировать в бессывороточной среде. Предпочтительно указанная клетка приспособлена для роста в суспензии. Антитело или фрагмент антитела, или связывающий домен может быть очищен из культуральной среды.

Предпочтительно указанное антитело или фрагмент антитела, или связывающий домен прошел аффинную очистку.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или фрагмент антитела, или связывающий домен, описанный в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Когда антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению изготовлен для применения в виде раствора для инъекций или инфузий для капельной инфузии, раствор для инъекций или инфузий может быть в любой форме водного раствора, суспензии или эмульсии или может быть изготовлен в виде твердого агента вместе с фармацевтически приемлемым носителем так, что агент будет растворен, суспендирован или эмульгирован в растворителе во время использования. Примеры растворителя, который используется в растворе для инъекций или инфузий для капельной инфузии, включают дистиллированную воду для инъекций, физиологический раствор, растворы глюкозы и изотонические растворы (например, в которых растворим хлорид натрия, хлорид калия, глицерин, маннит, сорбит, борная кислота, бура, пропиленгликоль и т.п.).

Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают стабилизаторы, солюбилизаторы, суспендирующие агенты, эмульгаторы, смягчающие агенты, буферные агенты, консерванты, антисептические агенты, регуляторы pH и антиоксиданты. В качестве стабилизаторов можно использовать различные аминокислоты, альбумин, глобулин, желатин, маннит, глюкозу, декстран, этиленгликоль, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, аскорбиновую кислоту, бисульфит натрия, тиосульфат натрия, эдетат натрия, цитрат натрия, дибутилгидрокситолуол и т.п. В качестве солюбилизаторов можно использовать спирты (например, этанол), полиолы (например, пропиленгликоль и полиэтиленгликоль), неионогенные поверхностно-активные вещества (например, полисорбат 20 (зарегистрированный товарный знак), полисорбат 80 (зарегистрированный товарный знак) и НСО-50) и т.п. В качестве суспендирующих агентов можно использовать глицерилмоностеарат, моностеарат алюминия, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, гидроксиметилцеллюлозу, лаурилсульфат натрия и т.п. В качестве эмульгаторов можно использовать гуммиарабик, альгинат натрия, трагакант и т.п. В качестве смягчающих агентов можно использовать бензиловый спирт, хлорбутанол, сорбит и т.п. В качестве буферных агентов можно использовать фосфатный буфер, ацетатный буфер, боратный буфер, карбонатный буфер, цитратный буфер, трис-буфер,

буфер с глутаминовой кислотой, буфер с эpsilon-аминокапроновой кислотой и т.п. В качестве консервантов можно использовать метилпарагидроксибензоат, этилпарагидроксибензоат, пропилпарагидроксибензоат, бутилпарагидроксибензоат, хлорбутанол, бензиловый спирт, хлорид бензалкония, дегидроацетат натрия, эдеат натрия, борную кислоту, буру и т.п. В качестве антисептических агентов можно использовать хлорид бензалкония, пара-гидроксибензойную кислоту, хлорбутанол и т.п. В качестве регуляторов рН можно использовать соляную кислоту, гидроксид натрия, фосфорную кислоту, уксусную кислоту и т.п. В качестве антиоксидантов можно использовать (1) водные антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия и сульфит натрия, (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, лецитин, пропилгаллат и α -токоферол, или (3) хелатирующие металлы агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота, сорбит, винная кислота и фосфорная кислота.

15 Раствор для инъекций или инфузий для капельной инфузии можно получить путем выполнения стерилизации на конечном этапе способа или асептической манипуляции, например, стерилизации путем фильтрации через фильтр с последующим заполнением асептического контейнера. Раствор для инъекций или инфузий для капельной инфузии можно использовать путем растворения высушенного в вакууме или лиофилизированного асептического порошка (который может включать порошок фармацевтически приемлемого носителя) в подходящем растворителе во время использования.

20 Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение эффективного количества антитела или фрагмента антитела, связывающего домена или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, субъекту, нуждающемуся в этом. Таким образом, согласно настоящему изобретению предложено антитело или фрагмент антитела, или связывающий домен, описанный в настоящем документе, для применения при лечении рака у субъекта. Согласно настоящему изобретению также предложен фармацевтический агент для применения при предотвращении, подавлении прогрессирования симптомов или рецидива и/или лечения рака, причем указанный фармацевтический агент содержит антитело или фрагмент указанного антитела, или связывающий домен, описанный в настоящем документе, в качестве активного ингредиента.

30 Пациенты, страдающие раком, обычно имеют аберрантные клетки, которые должны быть удалены из организма. Термин «аберрантные клетки» в контексте настоящего

документа включает опухолевые клетки, более конкретно опухолевые клетки, присутствующие на любом типе раковых тканей, связанных с типами рака, коррелировавшими с более высокой, чем нормальная, экспрессией TGF- β RII. Аберрантные клетки в настоящем документе также относятся к клеткам, имеющим

5 повышенную передачу сигналов вследствие повышенной экспрессии TGF- β и/или высвобождения TGF- β , и тем, которые образуют подавляющую среду, снижающую эффективность противоопухолевого иммунитета из-за патологической передачи сигналов и/или экспрессии TGF- β или более высокой, чем нормальная, экспрессии TGF- β , TGF- β RI и/или TGF- β RII, и/или более высокого, чем нормальное, высвобождения латентного TGF-

10 β .

Антитело или фрагмент антитела, или связывающий домен согласно настоящему изобретению будет эффективным при лечении нескольких типов рака, включая, например, типы рака, коррелировавшие с более высоким, чем обычно, уровнем передачи сигналов TGF- β , в частности, с более высокой, чем нормальная, экспрессией TGF- β RII. Примеры

15 включают, но не ограничиваются перечисленными, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак желудка, глиобластому, рак шеи, гепатоцеллюлярную карциному, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, меланому, миелодиспластический синдром, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы и рак почек.

Антитело или фрагмент антитела, или связывающий домен согласно настоящему изобретению блокирует связывание TGF- β человека с TGF- β RII человека на клетке, что ингибирует передачу сигналов TGF- β RII. Это приводит к снижению пролиферации вредных или аберрантных клеток и/или усилению противоопухолевого иммунитета и другим благоприятным эффектам.

20

Таким образом, согласно настоящему изобретению также предложен способ блокирования связывания TGF- β человека с TGF- β RII человека на клетке, причем указанный способ включает доставку антитела или фрагмента антитела, или связывающего домена, описанного в настоящем документе, к клетке и обеспечение связывания антитела или фрагмента антитела с TGF- β RII человека клетки, с

30 блокированием таким образом связывания TGF- β человека с TGF- β RII человека на клетке. Это может быть способ *in vitro*.

В зависимости от целевой активности антитело согласно настоящему изобретению может иметь модулированную эффекторную функцию. Антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ), также называемая антителозависимой клеточно-опосредуемой

цитотоксичностью, представляет собой механизм клеточно-опосредуемой иммунной защиты, при котором эффекторная клетка иммунной системы активно лизирует клетку-мишень, антигены мембранной поверхности которой были связаны специфичными антителами. Эффекторная функция АЗКЦ обычно опосредуется рецепторами Fc (FcR).

- 5 Рецепторы являются ключевыми иммунорегуляторными рецепторами, связывающими опосредуемый антителами (гуморальный) иммунный ответ с клеточными эффекторными функциями. Были идентифицированы рецепторы для всех классов иммуноглобулинов, включая Fc γ R (IgG), Fc ϵ RI (IgE), Fc α RI (IgA), Fc μ R (IgM) и Fc δ R (IgD). Существуют три класса рецепторов IgG человека на лейкоцитах: CD64 (Fc γ RI), CD32 (Fc γ RIIa, Fc γ RIIb и Fc γ RIIc) и CD16 (Fc γ RIIIa и Fc γ RIIIb). Fc γ RI классифицируется как рецептор с высокой аффинностью (наномолярный диапазон KD), в то время как Fc γ RII и Fc γ RIII имеют аффинность от низкой до средней (микромолярный диапазон KD). При антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) Fc ν R на поверхности эффекторных клеток (естественные клетки-киллеры, макрофаги, моноциты и эозинофилы) связываются с областью Fc IgG, которая сама связана с клеткой-мишенью. При связывании запускается сигнальный путь, который приводит к секреции различных веществ, таких как литические ферменты, перфорин, гранзимы и фактор некроза опухоли, которые опосредуют разрушение клетки-мишени. Уровень эффекторной функции АЗКЦ варьируется для подтипов IgG человека. Хотя это зависит от аллотипа и конкретного Fc ν R, говоря простыми словами, эффекторная функция АЗКЦ является высокой для IgG1 и IgG3 человека и низкой для IgG2 и IgG4. Данные о сайте связывания Fc ν R на антителе привели к получению сконструированных антител, которые не обладают эффекторными функциями АЗКЦ.
- 10
15
20

- Другой тип эффекторной функции не зависит от эффекторных клеток и называется комплемент-зависимой цитотоксичностью (КЗЦ). Это эффекторная функция антител IgG и IgM. Это еще один механизм действия, с помощью которого терапевтические антитела или фрагменты антител могут обеспечивать противоопухолевый эффект. КЗЦ инициируется, когда C1q, инициирующий компонент классического пути комплемента, фиксируется на части Fc антител, связанных с мишенью. Это первый этап сложного каскада активации комплемента, который в конечном итоге может привести к лизису клеток, меченых антителами.
- 25
30

В антителе согласно настоящему изобретению АЗКЦ-активность может быть усилена с помощью различных методик путем незначительной модификации константной области, одной из которых является удаление фукозы. Удаление фукозы привело к

повышению противоопухолевой активности в нескольких моделях *in vivo* (Junttila et al., Cancer Research (2010), Vol. 70(22), pp. 4481-4489). Можно применять технологию афукозилирования, что предотвращает фукозилирование N-связанной углеводной структуры в области Fc.

5 В антителе согласно настоящему изобретению эффекторная функция также может быть снижена или устранена. Например, лейцин в положении 235 в соответствии с системой нумерации ЕС может быть заменен глицином, и/или глицин в положении 236 в соответствии с системой нумерации ЕС может быть заменен аргинином. Такая(ие) модификация(ии) гарантирует(ют), что связывание с рецептором Fc и/или эффекторная
10 функция устраняется или уменьшается. Другие замены, делеции или вставки с тем же эффектом, известные в данной области техники, также охватываются настоящим изобретением.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ ингибирования передачи сигнала в клетку, индуцированной связыванием TGF- β человека с TGF- β RII
15 человека клетки, причем указанный способ включает доставку антитела или фрагмента антитела, или связывающего домена, описанного в настоящем документе, к клетке и обеспечение связывания антитела или фрагмента антитела с TGF- β RII человека клетки, чтобы ингибировать тем самым передачу сигнала в клетку. Это может быть способ *in vitro*.

20 Согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения или ингибирования метастазирования, причем указанный способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или фрагмента антитела, связывающего домена или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

Антитело или фрагмент антитела, или связывающий домен согласно настоящему
25 изобретению можно использовать при лечении рака в качестве единственной терапии, но его также можно комбинировать с другими противораковыми агентами. Другие противораковые агенты включают, но не ограничиваются перечисленными, терапевтические антитела, которые нацелены на одни и те же или разные опухолевые антигены или модулируют элементы иммунной системы, агенты, используемые в
30 химиотерапии (например, циклофосфамид), и агенты, используемые в гормональной терапии или в приложениях, связанных с локализованным введением, включая онколитический вирус. Лечение антителом или фрагментом антитела, или связывающим доменом согласно настоящему изобретению также можно комбинировать с другими противораковыми способами лечения, такими как, например, хирургическое

вмешательство или лучевая терапия. Комбинации лечения могут быть одновременными, раздельными или последовательными.

В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения слова «содержать», «включать» и «имеющий», а также варианты, такие как «содержит», «содержащий», «включает» и «включающий», следует толковать включительно. То есть эти слова
5 предназначены для передачи возможного включения других элементов или целых чисел, не упомянутых конкретно, если позволяет контекст.

Артикли (соотв., «a» и «an» в исходном тексте на английском языке) используются в настоящем документе для обозначения одного или более чем одного (то есть, одного или
10 по меньшей мере одного) грамматического объекта артикля. В качестве примера, «элемент» может означать один элемент или более одного элемента.

«Множество» означает два или более.

Следует обратить внимание, что в настоящем описании, если не указано иное, положения аминокислот, отнесенные к CDR и каркасам в вариабельной области антитела
15 или фрагмента антитела, указаны в соответствии с нумерацией Kabat (см. Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991)). Аминокислоты в константных областях указаны в соответствии с системой нумерации ЕС, основанной на положениях аминокислот по Kabat (см. Sequences of
20 proteins of immunological interest, NIH Publication No. 91-3242).

Номера доступа приведены главным образом для обеспечения дополнительного метода идентификации мишени, фактическая последовательность связанного белка может варьироваться, например, из-за мутации в кодирующем гене, такой как мутации,
возникающие при некоторых видах рака и т.п. Антигенсвязывающий сайт связывает антиген и ряд его вариантов, таких как те, которые экспрессируются некоторыми антиген-
25 положительными иммунными или опухолевыми клетками.

При ссылке на ген или белок в настоящем документе указанная ссылка предпочтительно относится к человеческой форме гена или белка. При ссылке на ген или белок в настоящем документе указанная ссылка относится к природному гену или белку и
вариантным формам гена или белка, которые могут детектироваться в опухолях, разных
30 видах рака и т.п., предпочтительно, которые могут детектироваться в человеческих опухолях, разных видах рака и т.п.

HGNC расшифровывается как Комитет по номенклатуре генов HUGO. Номер, следующий за аббревиатурой, представляет собой номер доступа, с помощью которого из базы данных HGNC можно получить информацию о гене и белке, кодируемом геном.

Entrez Gene обеспечивает номер доступа или идентификатор гена, с помощью которого из базы данных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации) можно получить информацию о гене или белке, кодируемом геном. Ensemble обеспечивает номер доступа, с помощью которого из базы данных Ensemble можно получить информацию о гене или белке, кодируемом геном. Ensembl – это совместный проект EMBL-EBI и Wellcome Trust Sanger Institute по разработке системы программного обеспечения, которая создает и поддерживает автоматическую аннотацию для выбранных эукариотических геномов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

10 На **Фигуре 1** представлены аминокислотные последовательности вариательной области V легкой цепи IGKV1-39 (Фигура 1A); вариательной области легкой цепи IGKV1-39/jk1 (Фигура 1B); и вариательной области легкой цепи IGKV1-39/jk5 (Фигура 1C).

На **Фигуре 2** представлены данные FACS по связыванию антител с эндогенно экспрессированным TGF- β RII на клетках CCD18Co. На Фигуре 2A приведена средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) фикоэритрина (ФЭ) антител, содержащих вариательные области тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 92 (отрицательный контроль); SEQ ID NO: 93; и SEQ ID NO: 94. На Фигуре 2B приведена СИФ ФЭ антител, содержащих вариательные области тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 92 (отрицательный контроль); SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 15 95; и SEQ ID NO: 96.

На **Фигуре 3** представлены данные ИФА по активности блокирования лиганда антител, содержащих вариательные области тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 92 (отрицательный контроль); SEQ ID NO: 93; и SEQ ID NO: 94 (Фигура 3A), и антител, содержащих вариательные области тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 92 (отрицательный контроль); SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 25 95; и SEQ ID NO: 96 (Фигура 3B).

На **Фигуре 4** представлено выравнивание аминокислотной последовательности, полученное с использованием приложения AlignX программного обеспечения Vector NTI Program Advance 11.5.2 тяжелых цепей, содержащих вариательные области тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 10 (среднее выравнивание); SEQ ID NO: 11 (выравнивание снизу); и SEQ ID NO: 12 (выравнивание сверху) с их соответствующими вариантами с созревшей аффинностью. Идентичные аминокислоты обозначены черными буквами на белом фоне; слабоподобные аминокислоты обозначены белыми буквами на

сером фоне; консервативные изменения обозначены черными буквами на сером фоне; и неподобные аминокислоты обозначены белыми буквами на темно-сером фоне.

На **Фигуре 5** показана аффинность связывания исходных антител (SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12) и вариантов с созревшей аффинностью (варианты SEQ ID NO: 10; варианты SEQ ID NO: 11; варианты SEQ ID NO: 12). k_a = скорость прямой реакции в 1/Мс. k_d = скорость обратной реакции в 1/с.

На **Фигуре 6** показаны данные репортерного анализа люциферазы для вариантов с созревшей аффинностью. По оси X показана концентрация антитела в мкг/мл. По оси Y показана кратность индукции комплекса Smad как меры ингибирования передачи сигналов TGF- β . На каждом графике А-К представлено сравнение активности вариантов с созревшей аффинностью с контрольным антителом (SEQ ID NO: 97). Исходный TGF- β включен в качестве контроля стимуляции TGF- β клеток.

На **Фигуре 7** показаны данные сканирования аланином. На **Фигуре 7А** представлен обзор идентификации и картирования критично важных остатков. На **Фигуре 7В** показана средняя интенсивность флуоресценции SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 12; и SEQ ID NO: 93, в процентах по сравнению с диким типом. **Фигура 7С** представляет собой таблицу, показывающую реактивность связывания SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 93; и SEQ ID NO: 98 (контроль), в процентах по сравнению с диким типом. Критично важные для связывания остатки обозначены прямоугольниками. На **Фигуре 7D** показано картирование критично важных остатков на TGF β RII.

На **Фигуре 8** показаны результаты скрининга различных биспецифичных антител, содержащих TGF- β RII-связывающий домен согласно настоящему изобретению, в репортерном анализе TGF- β . По оси X показана концентрация антитела в мкг/мл. По оси Y показана кратность индукции передачи сигналов Smad. На каждом из графиков А-Е приведено сравнение активности биспецифичных антител, содержащих один TGF- β RII-связывающий домен, с антителом для положительного контроля, которое, как известно, блокирует связывание лиганда с TGF- β RII (+), как описано в Примере 1. Исходный TGF- β включен в качестве контроля стимуляции TGF- β клеток.

А) Δ Домен, связывающий TGF- β RII, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76; \square Домен, связывающий TGF- β RII, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 61; \bullet Домен, связывающий TGF- β RII, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 26.

В) ○ Домен, связывающий TGF-βRII, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70; * Домен, связывающий TGF-βRII, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70; □ Домен, связывающий TGF-βRII, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 61; ● Домен, связывающий TGF-βRII, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86; Δ Домен, связывающий TGF-βRII, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 65.

С) * Домен, связывающий TGF-βRII, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 65; ○ Домен, связывающий TGF-βRII, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40; ● Домен, связывающий TGF-βRII, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12; □ Домен, связывающий TGF-βRII, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76; Δ Домен, связывающий TGF-βRII, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 26.

Д) ● Домен, связывающий TGF-βRII, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12; □ Домен, связывающий TGF-βRII, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85.

Е) ● Домен, связывающий TGF-βRII, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86.

Следующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение, но никоим образом не ограничивают настоящее изобретение.

ПРИМЕРЫ

30 Пример 1 – Получение антител

Трансгенных мышей, содержащих общую легкую цепь IGKV1-39 (мышь MeMo[®]), иммунизировали TGF-βRII человека (изоформа А), что вызывает иммунный ответ, включая продукцию антител, специфичных в отношении TGF-βRII человека. Собирали лимфоидный материал иммунизированных мышей, из которого экстрагировали

нуклеиновые кислоты и использовали для синтеза кДНК, кодирующей переменные области тяжелой цепи таких антител. кДНК использовали для создания библиотек фагового дисплея, из которых с использованием робота для отбора Kingfisher отбирали Fab, связывающие TGF- β RII человека.

5 Два раунда отборов на основе аффинности с различными концентрациями биотинилированного рекомбинантного белка выполняли с использованием робота Kingfisher. TGF- β RII-Fc человека биотинилировали с использованием набора EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin (ThermoFisher; № по каталогу 21217) в соответствии с протоколом производителя, распределяли на аликвоты и хранили при -20°C до дальнейшего
10 использования. Два последующих раунда отборов в растворе выполняли с биотинилированным TGF- β RII-Fc человека с использованием робота Kingfisher. В первом раунде отбора использовали три разные концентрации белка. В качестве отрицательного контроля включали отборы без антигена. 50 мкг/мл общего IgG человека (Sigma; № по каталогу 1456) добавляли в раствор во время всех инкубаций фаговых библиотек, чтобы
15 свести к минимуму отбор агентов, связывающих Fc. После промывки связанный фаг элюировали трипсином. Выход фага определяли точечным методом, при котором клетки TG1 инфицировали и высевали на чашки с LB-агаром amp/glu для отбора отдельных колоний для скрининга. Второй раунд отбора выполняли с использованием выходов первого раунда. Во втором раунде отбора TGF- β RII-Fc-биотин использовали с
20 уменьшением количества белка, начиная с концентрации, использованной для соответствующего выхода первого раунда отбора.

Колонии собирали в 96-луночные планшеты для приготовления периплазматических экстрактов, содержащих растворимый Fab. Полученные Fab-содержащие фракции использовали для идентификации TGF- β RII-специфичных клонов с использованием
25 FACS.

Клетки HEK293T, временно трансфицированные TGF- β RII человека, использовали для скрининга методом FACS. Конечная концентрация Fab составляла от 0,5 до 5 мкг/мл. Fab, связывающие TGF- β RII, детектировали с использованием козьих антител к легкой каппа-цепи (Ab0646; 5 мкг/мл), а затем ФЭ-конъюгированных кроличьих антител к козьему белку (Ab0330; разведение 1/100).
30

Выполняли два раунда иммунизации с получением большой панели Fab для дальнейшей характеристики. Во втором раунде иммунизации для повышения уровней экспрессии использовали другой вектор, и мышей совместно иммунизировали TGF- β RI

человека. Это могло способствовать более значительному иммунному ответу, вырабатываемому у мышей, наблюдаемому во время второго раунда иммунизации.

5 Антитело для положительного контроля получали на основании информации, полученной из US 2010/0119516. Это антитело для положительного контроля содержит две переменные области тяжелой цепи и две переменные области легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности MAT к TGF1 (SEQ ID NO: 97 и SEQ ID NO: 135, соответственно), описанные в настоящем документе. Сообщается, что антитело, содержащее эти переменные области тяжелой и легкой цепей, блокирует связывание лиганда с TGF- β RII.

10 Получали антитело к RSV для отрицательного контроля. Это антитело для отрицательного контроля содержит две переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 136, и две переменные области легкой цепи, приведенные в SEQ ID NO: 16.

Пример 2 – Характеристика антител

15 Фрагменты VH Fab, связывающих TGF- β RII, идентифицированные в Примере 1, повторно клонировали в формат экспрессии IgG для экспрессии и очистки IgG из клеток FreeStyle™ 293.

Связывание антигена

20 Антитела подвергали скринингу для определения связывания с эндогенно экспрессируемым TGF- β RII человека на клетках CCD18Co с использованием FACS. Результаты показаны на **Фигуре 2**. Все протестированные антитела показали сходное связывание с клетками CCD18Co.

25 Fab, содержащий переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, полученный в первом раунде иммунизации, содержит ту же последовательность HCDR3, что и Fab, полученные во втором раунде иммунизации, например, Fab, содержащие переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93. Это свидетельствует о том, что у мышей рекомбинация генных сегментов VDJ в значительной степени одинакова в ответ на этот антиген.

30 *Аффинность связывания*

Аффинность связывания антител, содержащих переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 93 и SEQ ID NO: 12, определяли с помощью SPR. Для этого антитела преобразовывали в двухвалентные IgG, моноспецифичные в отношении TGF β RII.

Антитела IgG к TGF- β RII захватывали на поверхности сенсорного чипа CM5 иммобилизованным антителом к CH1 (Ab0669; BD, № по каталогу BD555784), а затем добавляли рекомбинантный TGF- β RII человека (R&D systems, № по каталогу 241-R2/CF; область Ile24-Aps195). Измерения проводили при 25°C. Связывание выполняли при pH

5 4,5. Результаты показаны в **Таблице 2**.

IgG	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_d (нМ)
SEQ ID NO: 10	$9,698 \times 10^5$	$4,313 \times 10^{-3}$	4,45
SEQ ID NO: 11	$1,232 \times 10^6$	$1,021 \times 10^{-2}$	8,29
SEQ ID NO: 93	$1,074 \times 10^6$	$7,104 \times 10^{-3}$	6,61
SEQ ID NO: 12	$1,028 \times 10^5$	$7,519 \times 10^{-4}$	7,31

Таблица 2. Аффинность связывания отобранных антител с TGF- β RII.

Блокирование лиганда

Активность образцов IgG по блокированию лиганда определяли с использованием ИФА.

10 Планшет для ИФА покрывали TGF- β 1 в концентрации 0,4 мкг/мл. TGF- β RII-Fc человека (R&D; № по каталогу 341-BR) добавляли с конечной концентрацией 0,01 мкг/мл. Антитела инкубировали в трехкратном диапазоне концентраций, начиная с конечной концентрации 10 мкг/мл. Антитело, которое специфично связывает столбнячный анатоксин, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 92, включали в качестве контроля. Антитела, которые связывают TGF- β RII-Fc человека, детектировали с использованием конъюгированного с биотином антитела к Fc человека (1:10000) и стрептавидина-ПХ (1:2000).

20 Как показано на **Фигуре 3**, все протестированные антитела показывают хорошую активность блокирования лиганда по сравнению с контрольным антителом. Значения ИК₅₀ отобранных антител представлены в **Таблице 3**.

IgG	ИК₅₀ (мкг/мл)
SEQ ID NO: 93	0,1551
SEQ ID NO: 10	0,138
SEQ ID NO: 11	0,5264
SEQ ID NO: 12	0,1252

Таблица 3. Значения ИК₅₀ отобранных антител.

Пример 3 – Созревание аффинности

Библиотеки фагового дисплея Fab с вариантными тяжелыми цепями, содержащими переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, и SEQ ID NO: 12, которые специфично связывают TGF- β RII и блокируют взаимодействие с лигандом и гетеродимеризацию TGF- β RII и TGF- β RI, получали для оценки возможности продуцирования антител с более высокой аффинностью. Конструировали библиотеку для получения переменных областей тяжелой цепи с повышенной аффинностью и обычно имеющих от трех до четырех вариаций: одну в CDR1, одну в CDR2 и одну или две в CDR3, при этом некоторое количество вариантов в целом имеет более 4 вариаций. Обзор вариантов представлен в виде выравнивания последовательностей на **Фигуре 4**.

Варианты с более высокой аффинностью отбирали с использованием двух различных методов отбора, оба с использованием биотинилированного TGF- β RII-Fc человека в качестве антигена и оба с использованием робота для отбора Kingfisher. Выполняли несколько раундов отбора. Первый раунд отбора включал отбор на основе аффинности, как описано в Примере 1, с использованием различных концентраций биотинилированного TGF- β RII-Fc. Только выход отбора с самой низкой концентрацией антигена, показывающий явное обогащение, впоследствии использовали в двух отдельных методах отбора. Первый метод отбора включает два дополнительных раунда отбора на основе аффинности, однако, в этот раз с дальнейшим снижением концентраций антигена по сравнению с оптимальной концентрацией антигена, использованной в предыдущем раунде отбора. Второй метод отбора также включает два дополнительных раунда отборов, которые оба основаны на аффинности за счет уменьшения концентраций антигена, а также на основе диссоциации за счет включения этапа промывки в присутствии избытка небитинилированного антигена.

50 мкг/мл общего IgG человека (Sigma; № по каталогу I4506) добавляли в раствор во время всех инкубаций фаговых библиотек, чтобы свести к минимуму отбор агентов, связывающих Fc. После промывки связанный фаг элюировали трипсином. Выход фага определяли точечным методом, при котором клетки TG1 инфицировали последовательными разведениями выходов фага и высевали на чашки с LB-агаром amp/glu для подсчета колоний на следующий день.

Выходы фагов сохраняли с использованием бактериальной инфекции для получения достаточного количества фагов для последующих отборов, а также для получения чашек с бактериальными колониями. Колонии собирали в 96-луночные планшеты для продукции

антител. Полученные антитела использовали для приготовления периплазматических экстрактов, содержащих растворимые Fab.

5 Варианты с созревшей аффинностью преобразовывали в двухвалентные IgG, моноспецифичные в отношении TGF β RII. Анализ методом SPR выполняли для определения аффинности вариантов в отношении TGF- β RII. Результаты показаны в **Таблице 4** и на **Фигуре 5**.

IgG	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_d (М)
SEQ ID NO: 44	1,37×10 ⁶	3,99×10 ⁻³	2,90×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 49	1,39×10 ⁶	5,24×10 ⁻³	3,76×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 53	1,43×10 ⁶	1,15×10 ⁻²	8,07×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 43	1,57×10 ⁶	6,20×10 ⁻³	3,96×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 40	1,46×10 ⁶	2,82×10 ⁻³	1,93×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 47	1,99×10 ⁶	7,83×10 ⁻³	3,94×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 48	1,31×10 ⁶	7,71×10 ⁻³	5,88×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 45	1,41×10 ⁶	6,68×10 ⁻³	4,74×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 41	1,36×10 ⁶	7,28×10 ⁻³	5,34×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 54	1,16×10 ⁶	1,33×10 ⁻²	1,15×10 ⁻⁸
SEQ ID NO: 55	1,58×10 ⁶	2,25×10 ⁻²	1,42×10 ⁻⁸
SEQ ID NO: 46	2,39×10 ⁶	8,94×10 ⁻³	3,74×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 42	2,16×10 ⁶	8,80×10 ⁻³	4,08×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 39	1,71×10 ⁶	5,26×10 ⁻³	3,08×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 50	1,17×10 ⁶	9,49×10 ⁻³	8,12×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 51	1,58×10 ⁶	8,23×10 ⁻³	5,21×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 52	1,92×10 ⁶	9,56×10 ⁻³	4,98×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 38	2,07×10 ⁶	7,97×10 ⁻³	3,85×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 56	8,74×10 ⁵	2,28×10 ⁻²	2,61×10 ⁻⁸
SEQ ID NO: 11	1,07×10 ⁶	1,29×10 ⁻²	1,21×10 ⁻⁸
SEQ ID NO: 84	2,32×10 ⁵	2,49×10 ⁻³	1,07×10 ⁻⁸
SEQ ID NO: 76	2,91×10 ⁵	1,90×10 ⁻³	6,54×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 71	1,95×10 ⁵	1,85×10 ⁻³	9,53×10 ⁻⁹
SEQ ID NO: 80	2,28×10 ⁵	1,93×10 ⁻³	8,46×10 ⁻⁹

SEQ ID NO: 88	$1,73 \times 10^5$	$2,38 \times 10^{-3}$	$1,38 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 73	$1,43 \times 10^5$	$2,46 \times 10^{-3}$	$1,72 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 67	$2,40 \times 10^5$	$2,07 \times 10^{-3}$	$8,63 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 77	$2,34 \times 10^5$	$2,61 \times 10^{-3}$	$1,11 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 75	$2,21 \times 10^5$	$1,91 \times 10^{-3}$	$8,63 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 85	$2,21 \times 10^5$	$3,88 \times 10^{-3}$	$1,76 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 58	$8,87 \times 10^4$	$1,79 \times 10^{-3}$	$2,02 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 65	$8,11 \times 10^4$	$1,58 \times 10^{-3}$	$1,95 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 59	$9,00 \times 10^4$	$1,66 \times 10^{-3}$	$1,85 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 79	$2,14 \times 10^5$	$2,27 \times 10^{-3}$	$1,06 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 60	$1,18 \times 10^5$	$1,98 \times 10^{-3}$	$1,68 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 83	$2,73 \times 10^5$	$1,94 \times 10^{-3}$	$7,12 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 70	$3,24 \times 10^5$	$1,97 \times 10^{-3}$	$6,08 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 74	$3,02 \times 10^5$	$1,57 \times 10^{-3}$	$5,18 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 69	$2,37 \times 10^5$	$2,20 \times 10^{-3}$	$9,27 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 68	$2,33 \times 10^5$	$2,20 \times 10^{-3}$	$9,41 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 63	$2,57 \times 10^5$	$2,00 \times 10^{-3}$	$7,80 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 89	$1,73 \times 10^5$	$3,13 \times 10^{-3}$	$1,81 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 82	$2,47 \times 10^5$	$2,26 \times 10^{-3}$	$9,15 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 91	$1,00 \times 10^5$	$3,60 \times 10^{-3}$	$3,59 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 72	$2,23 \times 10^5$	$2,63 \times 10^{-3}$	$1,18 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 66	$9,70 \times 10^4$	$2,18 \times 10^{-3}$	$2,25 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 86	$1,13 \times 10^5$	$3,21 \times 10^{-3}$	$2,85 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 61	$6,58 \times 10^4$	$1,68 \times 10^{-3}$	$2,56 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 78	$1,28 \times 10^5$	$1,96 \times 10^{-3}$	$1,53 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 81	$1,87 \times 10^5$	$2,61 \times 10^{-3}$	$1,40 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 90	$1,05 \times 10^5$	$2,91 \times 10^{-3}$	$2,77 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 57	$9,07 \times 10^4$	$2,86 \times 10^{-3}$	$3,15 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 87	$1,49 \times 10^5$	$2,31 \times 10^{-3}$	$1,55 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 12	$1,17 \times 10^5$	$2,51 \times 10^{-3}$	$2,14 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 22	$6,10 \times 10^5$	$2,07 \times 10^{-3}$	$3,39 \times 10^{-9}$

SEQ ID NO: 23	$6,11 \times 10^5$	$3,65 \times 10^{-3}$	$5,97 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 36	$9,15 \times 10^5$	$9,81 \times 10^{-3}$	$1,07 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 27	$1,13 \times 10^6$	$6,18 \times 10^{-3}$	$5,49 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 29	$1,43 \times 10^6$	$9,27 \times 10^{-3}$	$6,47 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 30	$3,35 \times 10^5$	$1,11 \times 10^{-2}$	$3,32 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 33	$1,02 \times 10^6$	$1,05 \times 10^{-2}$	$1,02 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 28	$1,54 \times 10^6$	$8,85 \times 10^{-3}$	$5,75 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 34	$1,13 \times 10^6$	$9,88 \times 10^{-3}$	$8,73 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 32	$1,35 \times 10^6$	$9,04 \times 10^{-3}$	$6,68 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 37	$9,53 \times 10^5$	$1,29 \times 10^{-2}$	$1,36 \times 10^{-8}$
SEQ ID NO: 35	$1,47 \times 10^6$	$1,23 \times 10^{-2}$	$8,38 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 26	$1,93 \times 10^6$	$7,95 \times 10^{-3}$	$4,11 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 24	$1,26 \times 10^6$	$4,96 \times 10^{-3}$	$3,95 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO: 10	$1,08 \times 10^6$	$8,41 \times 10^{-3}$	$7,81 \times 10^{-9}$

Таблица 4. Аффинность связывания вариантов с созревшей аффинностью и исходных антител.

Репортерный анализ вариантов

Варианты с созревшей аффинностью преобразовывали в двухвалентный формат IgG, как описано в Примере 2. Полученные антитела использовали в репортерном анализе TGF- β RII на основе люциферазы для тестирования способности антител ингибировать индуцированную лигандом активацию рецептора.

Клетки FreeStyle™ 293 временно трансфицировали CAGA₁₂, несущим репортер люциферазу. На следующий день трансфицированные клетки высевали и стимулировали 1 нг/мл hTGF- β 1 в присутствии/в отсутствие 6-точечного полулогарифмического последовательного разведения антитела к TGF- β RII. Одновременно добавляли антитело к TGF- β RII. Начальная и самая высокая концентрация антитела составляла 10 мкг/мл, а самая низкая концентрация составляла 0,03 мкг/мл. Смесь клеток FreeStyle™ 293, hTGF- β 1 и антитела к TGF- β RII инкубировали 3 часа в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂. Каждый планшет содержит титрование отрицательного конкурентного контроля, содержащего переменную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 97, и одну лунку, которая не содержит TGF- β . В качестве регистрируемого показателя добавляли реагент для детектирования Steady-Glo системы для анализа люциферазы и после 5-минутной

инкубации измеряли люциферазу на EnVision. Кратность ответа рассчитывали следующим образом:

$$5 \quad \frac{((\text{образец с IgG X + TGFбета}) - (\text{отрицательный контроль IgG + TGFбета}))}{((\text{положительный контроль IgG + TGFбета}) - (\text{отрицательный контроль IgG + TGFбета}))} * 100$$

Результаты показаны на **Фигуре 6**. Эти данные показывают, что несколько из вариантов проявляют улучшенную активность блокирования лиганда по сравнению с их исходными антителами. Значения ИК₅₀ отобранных антител представлены в **Таблице 5**.

IgG	ИК₅₀ (мкг/мл)
SEQ ID NO: 10	1,53
SEQ ID NO: 12	0,86
SEQ ID NO: 24	0,04
SEQ ID NO: 26	0,59
SEQ ID NO: 40	0,08
SEQ ID NO: 43	0,04
SEQ ID NO: 46	н/п
SEQ ID NO: 47	0,19
SEQ ID NO: 48	0,25
SEQ ID NO: 54	16,40
SEQ ID NO: 67	0,25
SEQ ID NO: 70	0,36
SEQ ID NO: 75	0,18
SEQ ID NO: 76	0,20
SEQ ID NO: 77	0,36
SEQ ID NO: 78	1,50
SEQ ID NO: 83	0,08
SEQ ID NO: 84	1,54
SEQ ID NO: 88	1,16

10 **Таблица 5. Значения ИК₅₀ отобранных вариантов с созревшей аффинностью и исходных антител.**

Пример 4 – Картирование эпитопов

Для идентификации остатков TGF-βRII, которые являются частью эпитопа, связанного полученными антителами, выполняли эксперименты с использованием

мутагенеза методом «дробовика» и стандартных методик (Davidson and Doranz, 2014). В качестве контроля в подходе мутагенеза методом «дробовика» использовали антитело, содержащее вариабельные области тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 98. Это антитело было неспособно блокировать связывание лиганда с рецептором и могло связывать рецептор в присутствии всех функциональных антител к TGF- β RII. Результаты показаны на **Фигуре 7**.

Пример 5 – TGF- β RII-блокирующая активность антител, содержащих TGF- β RII-связывающий домен

Антитела к RSVxTGF- β RII и антиген AxTGF- β RII подвергали скринингу в репортерном анализе TGF β .

Получали биспецифичные антитела, содержащие первый связывающий домен, который связывает TGF- β RII, содержащий область VH из набора антител, как описано в настоящем документе, и второй связывающий домен, который связывает RSV, содержащий область VH, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 136, или второй связывающий домен, который связывает антиген, экспрессируемый на той же клетке, что и TGF- β RII (антиген A). Антиген A представляет собой произвольно выбранный антиген, не реагирующий с TGF β и не влияющий на сигнальный каскад, протестированный в репортерном анализе TGF β . Также включали антитело для положительного контроля и антитело для отрицательного контроля, как описано в Примере 1.

В репортерном анализе TGF β используется несущий люциферазу вектор CAGA₁₂, содержащий 12 копий блока CAGA, которые представляют собой связывающие SMAD3 и SMAD4 последовательности [Dennler et al, 1998]. Связывание TGF β с TGF- β RII приводит к фосфорилированию TGF- β RI. Фосфорилирование TGF- β RI инициирует сигнальный каскад, который приводит к фосфорилированию и активации SMAD2 и SMAD3, которые затем образуют комплекс с SMAD4. Затем комплекс SMAD перемещается в ядро и связывается с элементом, связывающим SMAD (SBE), в ядре, что приводит к транскрипции и экспрессии генов, чувствительных к TGF β /SMAD. CAGA₁₂, несущий репортер люциферазу, можно использовать для мониторинга активации под действием TGF β и скрининга антител, блокирующих TGF- β RII, после трансфекции репортера в клетки млекопитающих.

Криоконсервированные клетки 293FF, стабильно трансфицированные для экспрессии антигена A, временно трансфицировали репортером TGF β . IgG тестировали в конечной концентрации от 10 мкг/мл до 100 пг/мл. Добавляли IgG в конечном объеме 25

мкл (4-кратно концентрированный). Затем добавляли 25 мкл hTGF β 1 (4-кратно концентрированный) до конечной концентрации 1 нг/мл. Добавляли 50 мкл суспензии трансфицированных клеток (5×10^4 клеток). В каждую лунку добавляли по 100 мкл субстрата Steady-Glo™ и инкубировали в течение 5 минут. Люминесценцию измеряли на 5 EnVision, а результаты анализировали с использованием Graphpad Prism.

Результаты показаны на Фигуре 8. Биспецифичные антитела, содержащие одновалентный связывающий домен для TGF- β RII и контрольный связывающий домен против RSV, а также биспецифичные антитела, содержащие одновалентный связывающий домен для TGF- β RII и антигена A, блокируют взаимодействие TGF- β с TGF- β RII.

10 Биспецифичное антитело, нацеленное на TGF- β RII и RSV, которое включает TGF- β RII-связывающие домены, содержащие область VH, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76 и 70, почти так же эффективно, как и двухвалентное моноспецифичное антитело для положительного контроля. Биспецифичные антитела, нацеленные на TGF- β RII и антиген A, которые включают TGF-

15 β RII-связывающий домен, содержащий область VH, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, 61, 86, 65, 12 и 76, являются более эффективными, чем двухвалентное моноспецифичное антитело для положительного контроля. Соответственно, TGF- β RII-связывающие домены согласно настоящему изобретению демонстрируют сравнимую, равную и лучшую способность блокировать

20 TGF- β RII в одновалентной форме, обеспечивая ряд приложений в виде одновалентных молекул, двухвалентных молекул или как одна или более валентностей, как включенные в мультиспецифичную молекулу.

Секвенирование переменных областей тяжелой цепи

Секвенировали нуклеиновые кислоты, кодирующие области VH набора антител, 25 которые, как было установлено, связывают TGF- β RII человека и блокируют взаимодействие с его лигандом. Информация о последовательностях представлена ниже.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO: 1: HCDR1 в соответствии с Kabat
 IYAMT

SEQ ID NO: 2: HCDR2 в соответствии с Kabat
 5 VISGSGGTTYADSVKG

SEQ ID NO: 3: HCDR3 в соответствии с Kabat
 RGQYRDIVGATDY

SEQ ID NO: 4: HCDR1 в соответствии с Kabat
 NAWMS

10 **SEQ ID NO: 5: HCDR2 в соответствии с Kabat**
 RIKTTISGGATDFAAPVKG

SEQ ID NO: 6: HCDR3 в соответствии с Kabat
 DLRDY

15 **SEQ ID NO: 7: HCDR1 в соответствии с Kabat**
 RYAMS

SEQ ID NO: 8: HCDR2 в соответствии с Kabat
 AISASGDRTHNTDSVKG

SEQ ID NO: 9: HCDR3 в соответствии с Kabat
 GIAASGKNYFDP

20 **SEQ ID NO: 10: Варибельная область тяжелой цепи**
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDIYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTT
 YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGQYRDIVGATDYWGQG
 TLVTVSS

SEQ ID NO: 11: Варибельная область тяжелой цепи
 25 QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTISGG
 ATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 12: Варибельная область тяжелой цепи
 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFR RYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDR
THNTDSVKGRFISISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAK GIAASGKNYFDPWGQG
 30 TLVTVSS

SEQ ID NO: 13: LCDR1 в соответствии с IMGT
 QSISSY

SEQ ID NO: 14: LCDR2 в соответствии с IMGT
 AAS

SEQ ID NO: 15: LCDR3 в соответствии с IMGT

QQSYSTPPT

SEQ ID NO: 16: Вариабельная область легкой цепи

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR

5 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 17: Константная область тяжелой цепи

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY

10 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR

EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK

SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 18: Константная область легкой цепи

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ

15 DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 19: LCDR1 в соответствии с Kabat

RASQSISSYLN

SEQ ID NO: 20: LCDR2 в соответствии с Kabat

AASSLQS

20 **SEQ ID NO: 21: LCDR3 в соответствии с Kabat**

QQSYSTPPT

SEQ ID NO: 22: Вариабельная область тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDINAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTT

YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGQYRDIVGATDYWGQG

25 TLVTVSS

SEQ ID NO: 23: Вариабельная область тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDIQAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTT

YYADSVQGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGQYRDIVGATDYWGQG

TLVTVSS

30 **SEQ ID NO: 24: Вариабельная область тяжелой цепи**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDIYRMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTT

YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGQYREIVGATDYWGQG

TLVTVSS

SEQ ID NO: 25: Вариабельная область тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFDIYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTT
 YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRSQYRDKVGATDYWGQG
 TLVTVSS

SEQ ID NO: 26: Вариабельная область тяжелой цепи

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDINAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTT
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRRGQYREIAGATDYWGQ
 GTLVTVSS

SEQ ID NO: 27: Вариабельная область тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFDIYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTIY
 10 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGQYRDI VGATDYWGQGT
 LVTVSS

SEQ ID NO: 28: Вариабельная область тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDIYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTV
 YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGQYRDIAGGTDYWGQG
 15 TLVTVSS

SEQ ID NO: 29: Вариабельная область тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFDIYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTT
 YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRSQYRDKVGATDYWGQG
 TLVTVSS

20 **SEQ ID NO: 30: Вариабельная область тяжелой цепи**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFRFDIYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTT
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRRGQYRRIVGATDYWGQ
 GTLVTVSS

SEQ ID NO: 31: Вариабельная область тяжелой цепи

25 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDINAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTT
 AYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGQYRYIAGATDYWGQG
 TLVTVSS

SEQ ID NO: 32: Вариабельная область тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDITAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTT
 30 YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGQYRDIAGATDYWGQG
 TLVTVSS

SEQ ID NO: 33: Вариабельная область тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFDIYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTT
 YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAQYRDKVGATDYWGQ
 GTLVTVSS

SEQ ID NO: 34: Вариабельная область тяжелой цепи

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDIYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTT
 YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGQYRYVVGATDYWGQ
 GTLVTVSS

SEQ ID NO: 35: Вариабельная область тяжелой цепи

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFDIYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTT
 YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGQYRHIAGATDYWGQG
 TLVTVSS

SEQ ID NO: 36: Вариабельная область тяжелой цепи

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFRFDIYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTT
 YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGQYRDIVGATDYWGQG
 TLVTVSS

SEQ ID NO: 37: Вариабельная область тяжелой цепи

20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDINAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGATT
 YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGQYREIQGANDYWGQG
 TLVTVSS

SEQ ID NO: 38: Вариабельная область тяжелой цепи

25 QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSRAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTISGG
 ATQFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRNYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 39: Вариабельная область тяжелой цепи

25 QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSRAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTVSG
 GATAFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRAYWGQGTLVTVS
 S

SEQ ID NO: 40: Вариабельная область тяжелой цепи

30 QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTYSG
GATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRDYWGQGTLVTV
 SS

SEQ ID NO: 41: Вариабельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSRAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTYSG
 GATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRKYWGQGTLVTVS
 S

SEQ ID NO: 42: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSRAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTISGG
ATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRAIWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 43: Варибельная область тяжелой цепи

5 QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFKFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTISGG
ATQFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 44: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTYSG
GATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRDYWGQGTLVTVS
10 S

SEQ ID NO: 45: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTYSG
GATEFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTDLRKYWGQGTLVTVS
S

15 SEQ ID NO: 46: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTISGG
ATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRAIWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 47: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSRAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTISGA
20 ATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 48: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFANAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTYSG
GATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTDLRKYWGQGTLVTVS
S

25 SEQ ID NO: 49: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFQFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTYSG
GATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRDYWGQGTLVTVS
S

SEQ ID NO: 50: Варибельная область тяжелой цепи

30 QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSNAHMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTYSGG
ATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTDLRQYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 51: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFANAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTYSG
GATEFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRTYWGQGTLVTVS
S

SEQ ID NO: 52: Варибельная область тяжелой цепи

5 QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTYSG
GATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRSYWGQGTLVTVS
S

SEQ ID NO: 53: Варибельная область тяжелой цепи

10 QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFQFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTISGG
ATEFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 54: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFVFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTFSG
GATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRKYWGQGTLVTVS
S

15 **SEQ ID NO: 55: Варибельная область тяжелой цепи**

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFHFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTISGG
ATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRAYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 56: Варибельная область тяжелой цепи

20 QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFKFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTISGG
KTEFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRRYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 57: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFAFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
HNTDSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIKRGKKNYFDPWGQGTL
VTVSS

25 **SEQ ID NO: 58: Варибельная область тяжелой цепи**

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFQFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
HNTDSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIKSGKNYFDPWGQGTL
VTVSS

SEQ ID NO: 59: Варибельная область тяжелой цепи

30 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
HNTDSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIKSGKNYFDPWGQGTL
VTVSS

SEQ ID NO: 60: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFKFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISASGDRT
 HNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGLAASGKNYFDPWGQGT
 LTVSS

SEQ ID NO: 61: Варибельная область тяжелой цепи

5 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFRFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSSAISASGDR
THNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIYASGKHYFDPWGQ
 GTLTVSS

SEQ ID NO: 62: Варибельная область тяжелой цепи

10 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
 KNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGTAAASGRNYFDPWGQGT
 LTVSS

SEQ ID NO: 63: Варибельная область тяжелой цепи

15 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFAFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISASGDRT
 KNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIAASGKNYFDPWGQGT
 LTVSS

SEQ ID NO: 64: Варибельная область тяжелой цепи

20 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
 HNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIFASGKHYFDPWGQGT
 LTVSS

SEQ ID NO: 65: Варибельная область тяжелой цепи

25 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFGRYAMSWVRQAPGKGLEWVSSAISASGDR
HHNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIAKSGKNYFDPWGQ
 GTLTVSS

SEQ ID NO: 66: Варибельная область тяжелой цепи

30 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFQFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSDISASGDRT
 HNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIARSGKNYFDPWGQGT
 LTVSS

SEQ ID NO: 67: Варибельная область тяжелой цепи

30 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
 LNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGTAAARGKNYFDPWGQGT
 LTVSS

SEQ ID NO: 68: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFAFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISAFGDRT
 HNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYFCAKGTAA SGKNFFDPWGQGT
 LVTVSS

SEQ ID NO: 69: Варибельная область тяжелой цепи

5 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
 KNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYFCAKGTAA SGKNFFDPWGQGT
 LVTVSS

SEQ ID NO: 70: Варибельная область тяжелой цепи

10 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFS RYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDR
TKNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYFCAKGTAAAGKNYFDPWGQ
 GTLVTVSS

SEQ ID NO: 71: Варибельная область тяжелой цепи

15 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFQFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISAHGDR
 THNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYFCAKGTAA SGKNYFDPWGQGT
 LVTVSS

SEQ ID NO: 72: Варибельная область тяжелой цепи

20 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTIRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSYISASGDRT
 HNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYFCAKGTAN SGKNYFDPWGQGT
 LVTVSS

SEQ ID NO: 73: Варибельная область тяжелой цепи

25 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
 HNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYFCAKGTAA ARGKNYFDPWGQGT
 LVTVSS

SEQ ID NO: 74: Варибельная область тяжелой цепи

30 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFERRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
 QNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYFCAKGTAA SGRNYFDPWGQGT
 LVTVSS

SEQ ID NO: 75: Варибельная область тяжелой цепи

30 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFEFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISAGGDRT
 ANTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYFCAKGTAA ARGKNYFDPWGQGT
 LVTVSS

SEQ ID NO: 76: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFAFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDR
TQNTDSVKGRFISISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGTAASGKNYFDPWGQG
 TLVTVSS

SEQ ID NO: 77: Варибельная область тяжелой цепи

5 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
 LNTDSVKGRFISISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGTAARGKNYFDPWGQGT
 LTVSS

SEQ ID NO: 78: Варибельная область тяжелой цепи

10 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFEFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
 DNTDSVKGRFISISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIARSGKNFFDPWGQGT
 LTVSS

SEQ ID NO: 79: Варибельная область тяжелой цепи

15 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFNFRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
 HNTDSVTGRFISISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGLAASGKNYFDPWGQGT
 LTVSS

SEQ ID NO: 80: Варибельная область тяжелой цепи

20 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFAFRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISAHGDR
 THNTDSVKGRFISISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGTAASGKNYFDPWGQGT
 LTVSS

SEQ ID NO: 81: Варибельная область тяжелой цепи

25 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
 HNTDSVKGRFISISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGLAASGKNFFDPWGQGT
 LTVSS

SEQ ID NO: 82: Варибельная область тяжелой цепи

30 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFAFRYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISASGDRT
 HNTDSVKGRFISISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGLASSGKNYFDPWGQGT
 LTVSS

SEQ ID NO: 83: Варибельная область тяжелой цепи

30 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFQFRYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISASGDRT
 HNTDSVKGRFISISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGLAASGKNYFDPWGQGT
 LTVSS

SEQ ID NO: 84: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFQFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDR
YHNTDSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGTAAASGKNYFDPWGQG
TLVTVSS

SEQ ID NO: 85: Варибельная область тяжелой цепи

5 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFKFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDY
THNTDSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIAKSGKNYFDPWGQG
TLVTVSS

SEQ ID NO: 86: Варибельная область тяжелой цепи

10 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFAFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDR
TRNTDSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIATSGKNYFDPWGQG
TLVTVSS

SEQ ID NO: 87: Варибельная область тяжелой цепи

15 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFKRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRS
HNTDSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGLAARGKNYFDPWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO: 88: Варибельная область тяжелой цепи

20 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFNFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
HNTDSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGTAAARGKNYFDPWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO: 89: Варибельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
HNTDSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIAASGKNFFDPWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO: 90: Варибельная область тяжелой цепи

25 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
HNTDSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIAARGKNYFDPWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO: 91: Варибельная область тяжелой цепи

30 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFRFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGDRT
HNTDSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIAARGKNFFDPWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO: 92: Варибельная область тяжелой цепи

EVQLVETGAEVKKPGASVKVSCASDYIFTKYDINWVRQAPGQGLEWMGWMSANTG
 NTGYAQKFQGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTETAPYYHFALD
 VWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 93: Вариабельная область тяжелой цепи

5 EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRVKTTVSG
 GTTDYAAAVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAIYYCTIDLRDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 94: Вариабельная область тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSSINTSGGNT
 FYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCAKGIAATGKNYFDPWGQGTLL
 10 TVSS

SEQ ID NO: 95: Вариабельная область тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSSINTSGGNT
 FYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKGIAAAGKNWFGPWGQGT
 LTVSS

15 **SEQ ID NO: 96: Вариабельная область тяжелой цепи**

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSSINTSGGNT
 YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGIAASGKNYFDPWGQGTLL
 TVSS

SEQ ID NO: 97: Вариабельная область тяжелой цепи

20 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGST
 KYSADSLKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADDTAVYYCAKEGWSFDSSGYRSWFDS
 WGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 98: Вариабельная область тяжелой цепи

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYY
 25 NP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSFRGGYTAFDVWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 99: IGKV1-39

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
 FSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQSYSTP

30 **SEQ ID NO: 100: IGKV1-39/jk5**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
 FSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQSYSTPPITFGQGTTRLEIK

SEQ ID NO: 101: Изоформа А TGF-βRII человека

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRF
STCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDASP
KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQVTGISLLPPLGVAIS
 VIIIIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLMFSEHCAIILED⁵DRSDISSTCANNINHNTPELL
 IELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFSDINLKHEN
 ILQFLTAEERKTELGKQYWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARGIAHLHS
 DHTPCGRP¹⁰KMPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSQVGT
 RYMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFPGSKVR
 EHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSWL¹⁵NHQGIQMV CETLTECWDHDPEARLTAQCVAER
 FSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK

SEQ ID NO: 102: Внеклеточный домен изоформы А TGF-βRII человека

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV
 CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSD
 ECNDNIIFSEEYNTSNPDLLL

15 SEQ ID NO: 103: Изоформа В TGFβRII человека

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHINND
 MIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDE
 NITLETVCHDPKLPYHDFILEDASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYN
 TSNPDLLLVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLMFSEHC
²⁰AIILED²⁵DRSDISSTCANNINHNTPELLIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAVK
 IFPYEEYASWKTEKDIFSDINLKHENILQFLTAEERKTELGKQYWLITAFHAKGNLQEYL
 TRHVISWEDLRKLGSSLARGIAHLHSDHTPCGRP³⁰KMPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCD
 FGLSLRLDPTLSVDDLANSQVGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVYSMALVL
 WEMTSRCNAVGEVKDYEPFPGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSWL³⁵NHQGIQM
 VCETLTECWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK

SEQ ID NO: 104: Внеклеточный домен изоформы В TGF-βRII человека

TIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHINNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDV
 RFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDASP
KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQ

30 SEQ ID NO: 105: HCDR1 в соответствии с Kabat

NAWMS

SEQ ID NO: 106: HCDR2 в соответствии с Kabat

RIKTTISGGATQFAAPVKG

SEQ ID NO: 107: HCDR3 в соответствии с Kabat

DLRDY

SEQ ID NO: 108: HCDR1 в соответствии с Kabat
RYAMS

SEQ ID NO: 109: HCDR2 в соответствии с Kabat

5 AISAGGDRTANTDSVKG

SEQ ID NO: 110: HCDR3 в соответствии с Kabat
GTAARGKNYFDP

SEQ ID NO: 111: HCDR1 в соответствии с Kabat
RYAMS

10 **SEQ ID NO: 112: HCDR2 в соответствии с Kabat**
AISASGDRTKNTDSVKG

SEQ ID NO: 113: HCDR3 в соответствии с Kabat
GTAAAGKNYFDP

15 **SEQ ID NO: 114: HCDR1 в соответствии с Kabat**
RYAMS

SEQ ID NO: 115: HCDR2 в соответствии с Kabat
AISASGDRYHNTDSVKG

SEQ ID NO: 116: HCDR3 в соответствии с Kabat
GTAASGKNYFDP

20 **SEQ ID NO: 117: HCDR1 в соответствии с Kabat**
RYAMS

SEQ ID NO: 118: HCDR2 в соответствии с Kabat
AISASGDRTHNTDSVKG

25 **SEQ ID NO: 119: HCDR3 в соответствии с Kabat**
GTAARGKNYFDP

SEQ ID NO: 120: HCDR1 в соответствии с Kabat
NYWMS

SEQ ID NO: 121: HCDR2 в соответствии с Kabat
RIKTTYSGGATDFAAPVKG

30 **SEQ ID NO: 122: HCDR3 в соответствии с Kabat**
DLRDY

SEQ ID NO: 123: HCDR1 в соответствии с Kabat
RYAMS

SEQ ID NO: 124: HCDR2 в соответствии с Kabat

SISASGDRTHNTDSVKG

SEQ ID NO: 125: HCDR3 в соответствии с Kabat

GLAASGKNYFDP

SEQ ID NO: 126: HCDR1 в соответствии с Kabat

5 RYAMS

SEQ ID NO: 127: HCDR2 в соответствии с Kabat

AISASGDRTDNTDSVKG

SEQ ID NO: 128: HCDR3 в соответствии с Kabat

GIARSGKNFFDP

10 **SEQ ID NO: 129: HCDR1 в соответствии с Kabat**

RAWMS

SEQ ID NO: 130: HCDR2 в соответствии с Kabat

RIKTTISGAATDFAAPVKG

SEQ ID NO: 131: HCDR3 в соответствии с Kabat

15 DLRDY

SEQ ID NO: 132: HCDR1 в соответствии с Kabat

RYAMS

SEQ ID NO: 133: HCDR2 в соответствии с Kabat

AISASGDRTLNTDSVKG

20 **SEQ ID NO: 134: HCDR3 в соответствии с Kabat**

GTAARGKNYFDP

SEQ ID NO: 135: Варибельная область легкой цепи

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA

RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK

25 **SEQ ID NO:136: Варибельная область тяжелой цепи**

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGST

KYSADSLKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRADDTAVYYCAKEGWSFDSSGYRSWFDS

WGQGTLVTVSS

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

(к ответу на запрос Формальной Экспертизы от 9 февраля 2024)

1. Антитело или фрагмент указанного антитела, которые специфично связываются с TGF- β RII человека, где указанное антитело или фрагмент антитела содержит любую из переменных областей тяжелой цепи (VH), выбранную из:

(A) VH, имеющей

(a) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 1,

(b) VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 2, и

(c) VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 3;

(B) VH, имеющей

(a) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 4,

(b) VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 5, и

(c) VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 6;

(C) VH, имеющей

(a) VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 7,

(b) VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 8, и

(c) VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 9.

2. Антитело или фрагмент указанного антитела по п. 1, где указанное антитело содержит аминокислотную последовательность VH, выбранную из:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDIYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSG
GTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGQYRDIVGATDYW
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10);

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKTTI
SGGATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRDYWGQGTIVT
VSS (SEQ ID NO: 11);

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISAS
GDRTHNTDSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGLIAASGKNYFDPWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 12),

или аминокислотную последовательность VH, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с ней.

3. Антитело или фрагмент указанного антитела, которые специфично связываются с внеклеточным доменом TGF- β RII человека, где указанное антитело содержит аминокислотную последовательность VH, выбранную из любой из SEQ ID NO: 22-24, 26-28, 32, 39, 40, 42, 43, 48, 51-53, 56, 61, 63, 65, 67, 70, 72, 74, 76, 79, 81, 83, 87, 93, или аминокислотную последовательность VH, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с ней.

4. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из пп. 1-3, где указанное антитело или фрагмент антитела дополнительно содержит:

вариабельную область легкой цепи (VL), имеющую

(a) VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 19,

(b) VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 20, и

(c) VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 21.

5. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из пп. 1-4, где указанное антитело содержит аминокислотную последовательность VL:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)
или аминокислотную последовательность VL, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с ней.

6. Антитело или фрагмент указанного антитела по п. 1 или 2, где указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 10, 11 или 12, и вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 16.

7. Антитело или фрагмент указанного антитела по п. 3, где указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую любую из SEQ ID NO: 22-24, 26-28, 32, 39, 40, 42, 43, 48, 51-53, 56, 61, 63, 65, 67, 70, 72, 74, 76, 79, 81, 83, 87, 93, и вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 16.

8. Антитело или фрагмент указанного антитела по п. 1 или 2, где указанное антитело содержит две переменные области тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 10, и две переменные области легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 16, две переменные области тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 11, и две переменные области легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 16, или две переменные области тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 12, и две переменные области легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 16.

9. Антитело или фрагмент указанного антитела по п. 3, где указанное антитело содержит две переменные области тяжелой цепи любой последовательности из SEQ ID NO: 22-24, 26-28, 32, 39, 40, 42, 43, 48, 51-53, 56, 61, 63, 65, 67, 70, 72, 74, 76, 79, 81, 83, 87, 93 и две переменные области легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 16.

10. Антитело по любому из пп. 1-9, где указанное антитело представляет собой антитело IgG.

11. Антитело по любому из пп. 1-10, где указанное антитело представляет собой антитело IgG1 или антитело IgG4.

12. Антитело по любому из пп. 1-11, где указанное антитело представляет собой антитело IgG1.

13. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из пп. 1-12, где указанное антитело или фрагмент антитела дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 17.

14. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из пп. 1-13, где указанное антитело или фрагмент антитела дополнительно содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 18.

15. Антитело по любому из пп. 1-14, где связывание указанного антитела с рецептором Fc устраняется или уменьшается.

16. Антитело по любому из пп.1-15, отличающееся тем, что указанное антитело дополнительно содержит:

константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 17 и

константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 18.

17. Связывающий домен, который специфично связывается с TGF- β RII человека, где указанный связывающий домен содержит:

любую из переменных областей тяжелой цепи (VH), выбранную из:

(A) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 12;

(B) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 26;

(C) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 40;

(D) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 61;

(E) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 65;

(F) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 70;

(G) VH, имеющей VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 76.

18. Связывающий домен по п. 17, где указанный связывающий домен содержит аминокислотную последовательность VH, выбранную из SEQ ID NO: 12, 26, 40, 61, 65, 70 и 76, или аминокислотную последовательность VH, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с ней.

19. Связывающий домен по п. 17 или 18, где указанное антитело, или фрагмент антитела, или связывающий домен дополнительно содержит:

переменную область легкой цепи (VL), имеющую

(a) VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 19,

(b) VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 20, и

(c) VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID No. 21.

20. Связывающий домен по любому из пп. 17-19, где указанное антитело или связывающий домен содержат аминокислотную последовательность VL:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)

или аминокислотную последовательность VL, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с ней.

21. Вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий любую из указанной тяжелой цепи и указанной легкой цепи или обе указанные цепи антитела или фрагмента антитела по любому из пп. 1-16, либо связывающий домен по любому из пп. 17-20.

22. Клетка, продуцирующая антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-16 или связывающий домен по любому из пп. 17-20.

23. Клетка по п. 22, где указанная клетка представляет собой рекомбинантную клетку, которая трансформирована вектором по п. 21.

24. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-16, или связывающий домен по любому из пп. 17-20, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

25. Применение фармацевтического агента при предотвращении, подавлении прогрессирования симптомов или рецидива и/или лечении рака, где указанный фармацевтический агент содержит антитело или фрагмент указанного антитела по любому из пп. 1-16, или связывающий домен по любому из пп. 17-20, в качестве активного ингредиента.

26. Применение по п. 25, где указанный рак представляет собой тип рака, коррелировавший с более высокой, чем нормальная, передачей сигналов TGF- β , в частности более высокой, чем нормальная, экспрессией TGF- β RII.

27. Применение по п. 25 или 26, где указанный рак выбран из группы, состоящей из: рака молочной железы, рака толстой кишки, колоректального рака, рака желудка, глиобластомы, рака шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, меланомы, миелодиспластического синдрома, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы и рака почек.

28. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, где указанный способ включает: введение указанному субъекту эффективного количества антитела или фрагмента антитела по любому из пп. 1-16, или связывающего домена по любому из пп. 17-20 или фармацевтической композиции по п. 24.

29. Способ блокирования связывания TGF- β человека с TGF- β RII человека на клетке, где указанный способ включает: доставку антитела или фрагмента антитела по любому из пп. 1-16, или связывающего домена по любому из пп. 17-20, к клетке и обеспечение связывания антитела, или фрагмента антитела, или связывающего домена с TGF- β RII

человека клетки, с блокированием таким образом связывания TGF- β человека с TGF- β RII человека на указанной клетке.

30. Способ ингибирования передачи сигнала в клетку, индуцированной связыванием TGF- β человека с TGF- β RII человека клетки, где указанный способ включает: доставку антитела или фрагмента антитела по любому из пп. 1-16, или связывающего домена по любому из пп. 17-20 к клетке и обеспечение связывания антитела, или фрагмента антитела, или связывающего домена с TGF- β RII человека клетки, с ингибированием таким образом передачи сигнала в указанную клетку.

31. Способ предотвращения или ингибирования метастазирования у субъекта, нуждающегося в этом, где указанный способ включает: введение указанному субъекту эффективного количества антитела, или фрагмента антитела по любому из пп. 1-16, или связывающего домена по любому из пп. 17-20 или фармацевтической композиции по п. 24.

Фигура 1

Фигура 1А

IGKV1-39 (SEQ ID NO: 99)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP

Фигура 1В

IGKV1-39/jk1 (SEQ ID NO: 16)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

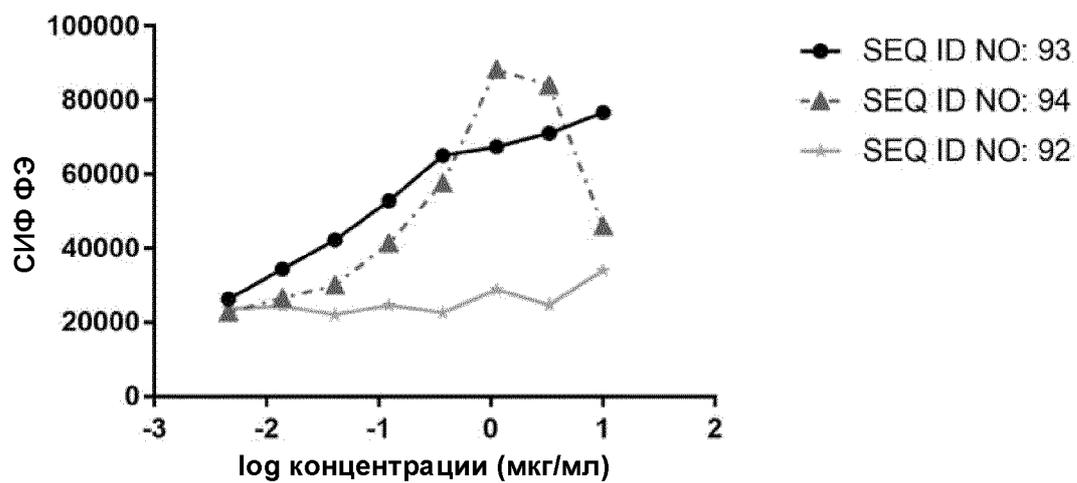
Фигура 1С

IGKV1-39/jk5 (SEQ ID NO: 100)

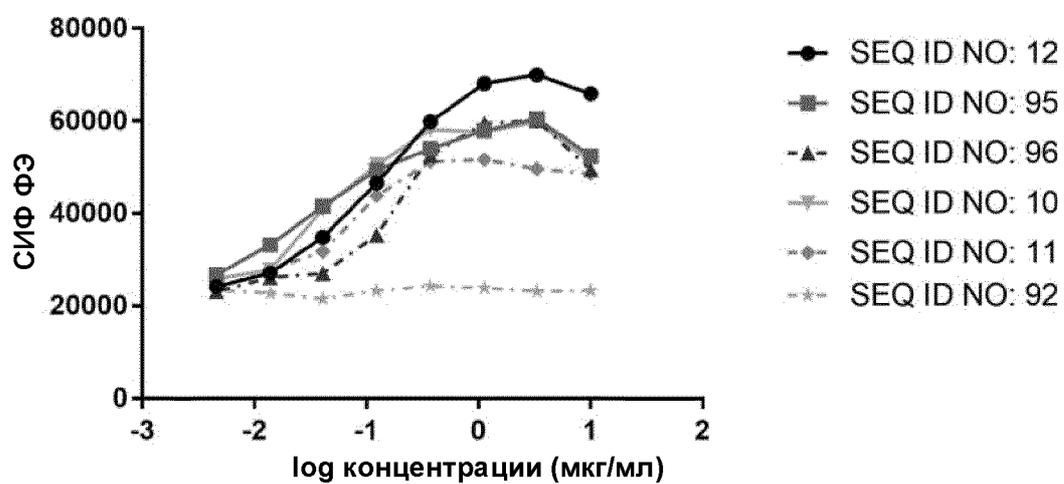
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK

Фигура 2

Фигура 2А

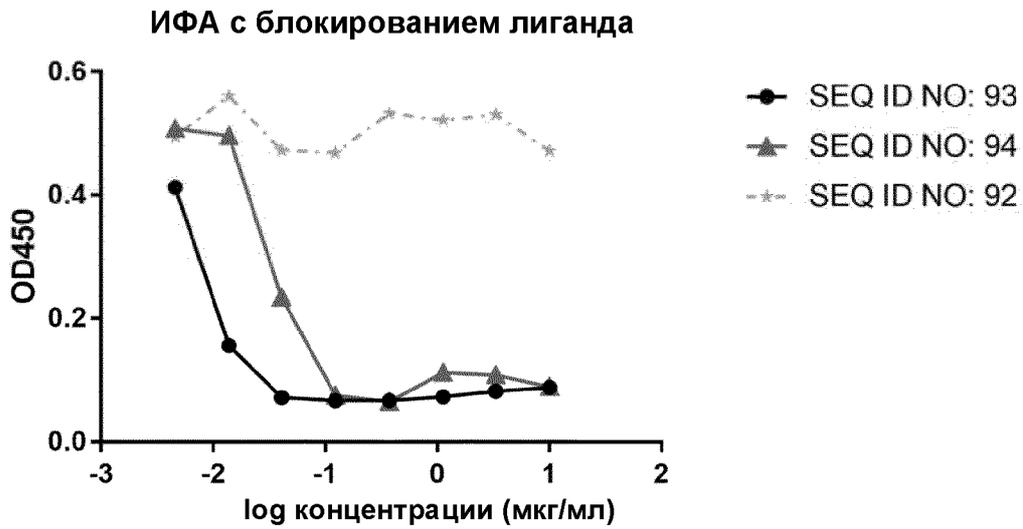


Фигура 2В

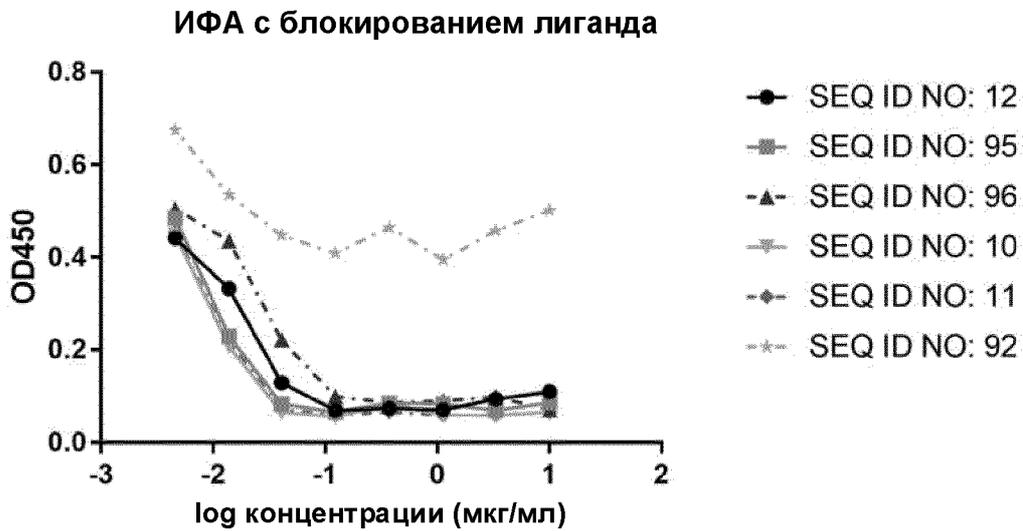


Фигура 3

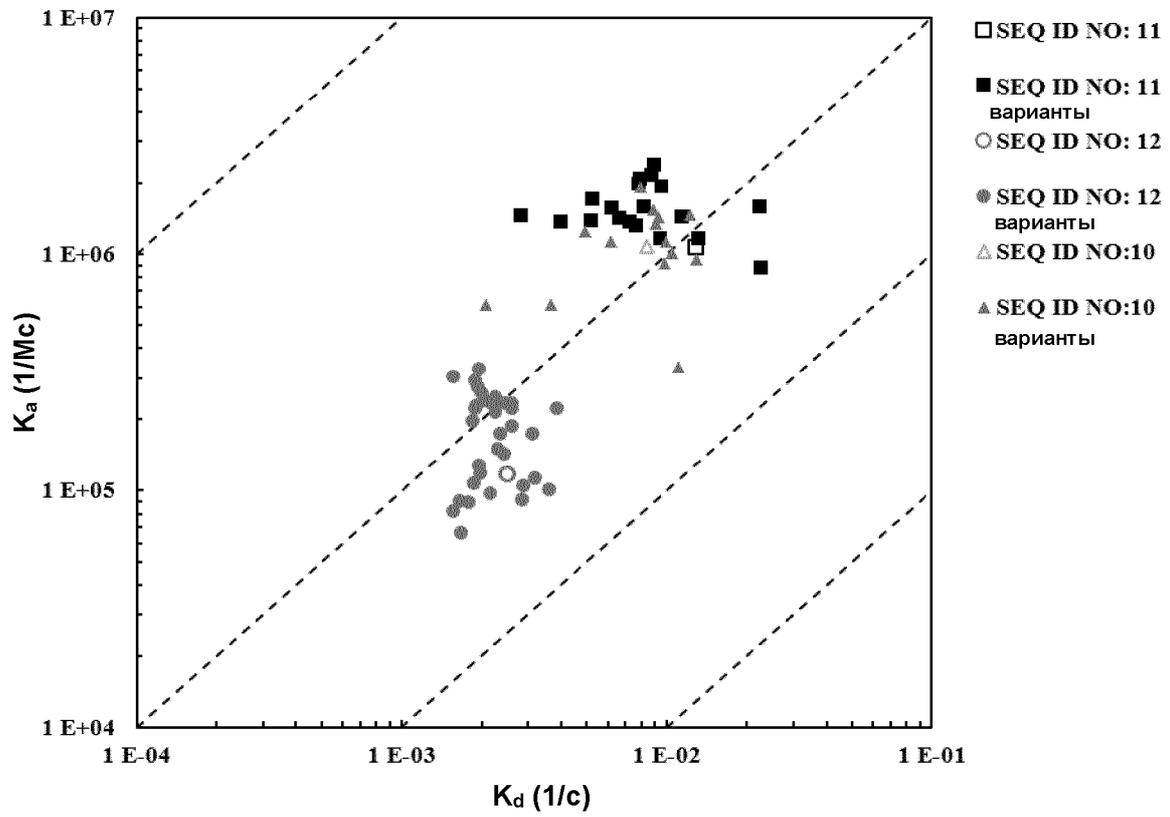
Фигура 3А



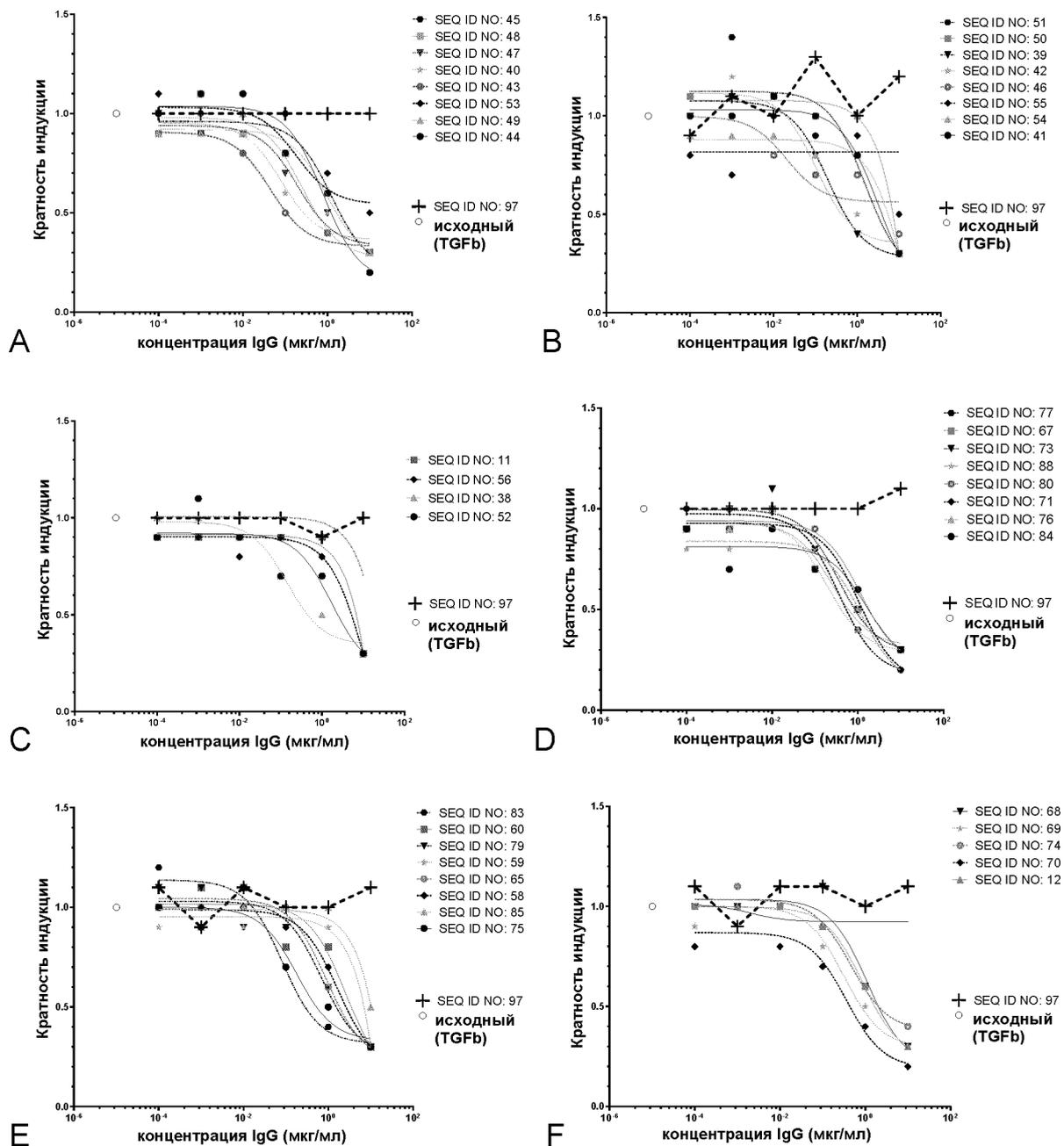
Фигура 3В



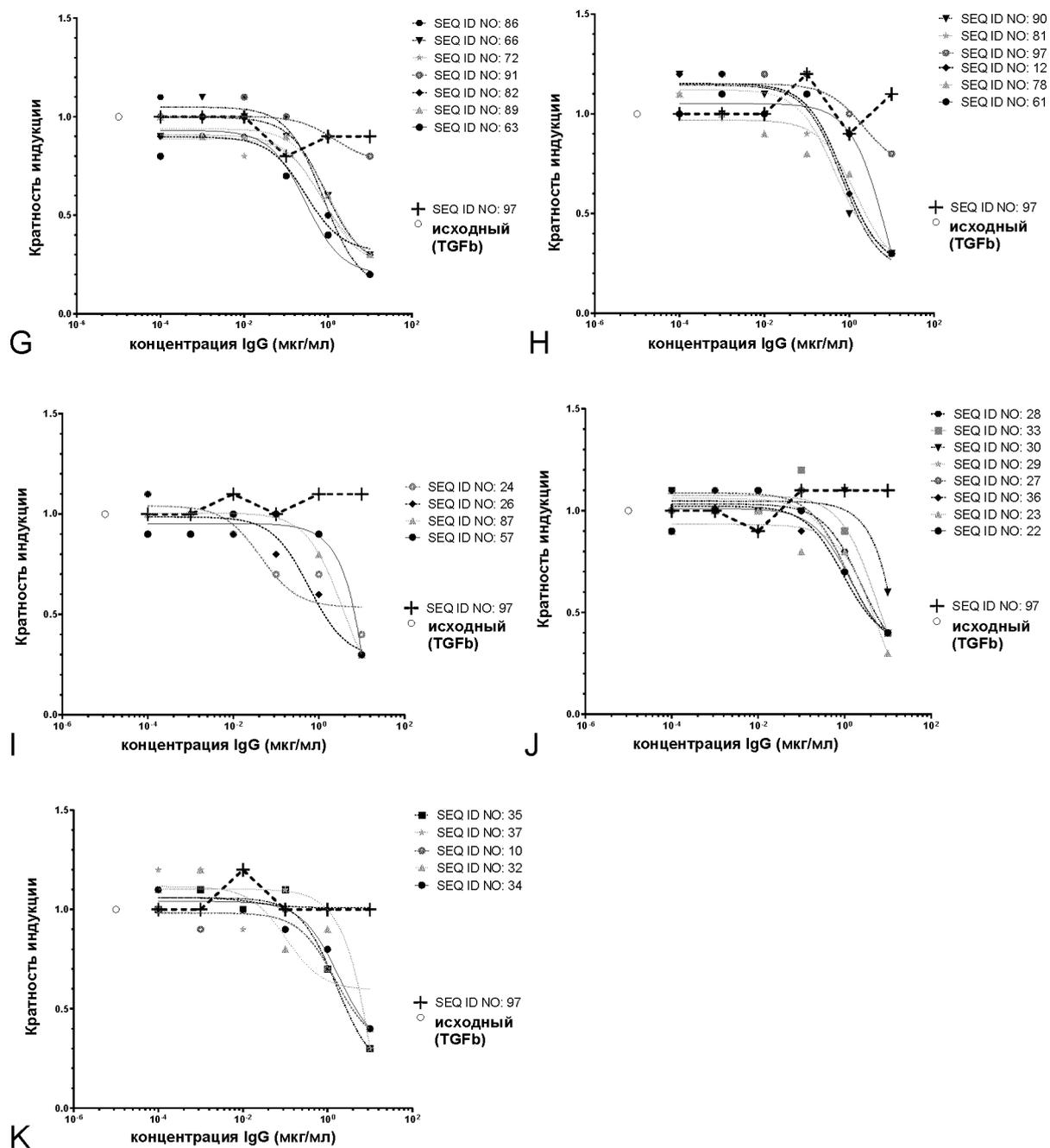
Фигура 5



Фигура 6

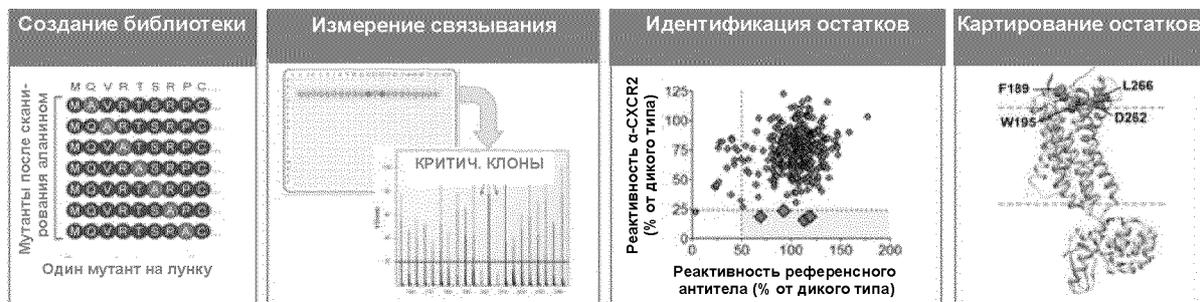


Фигура 6 продолж.

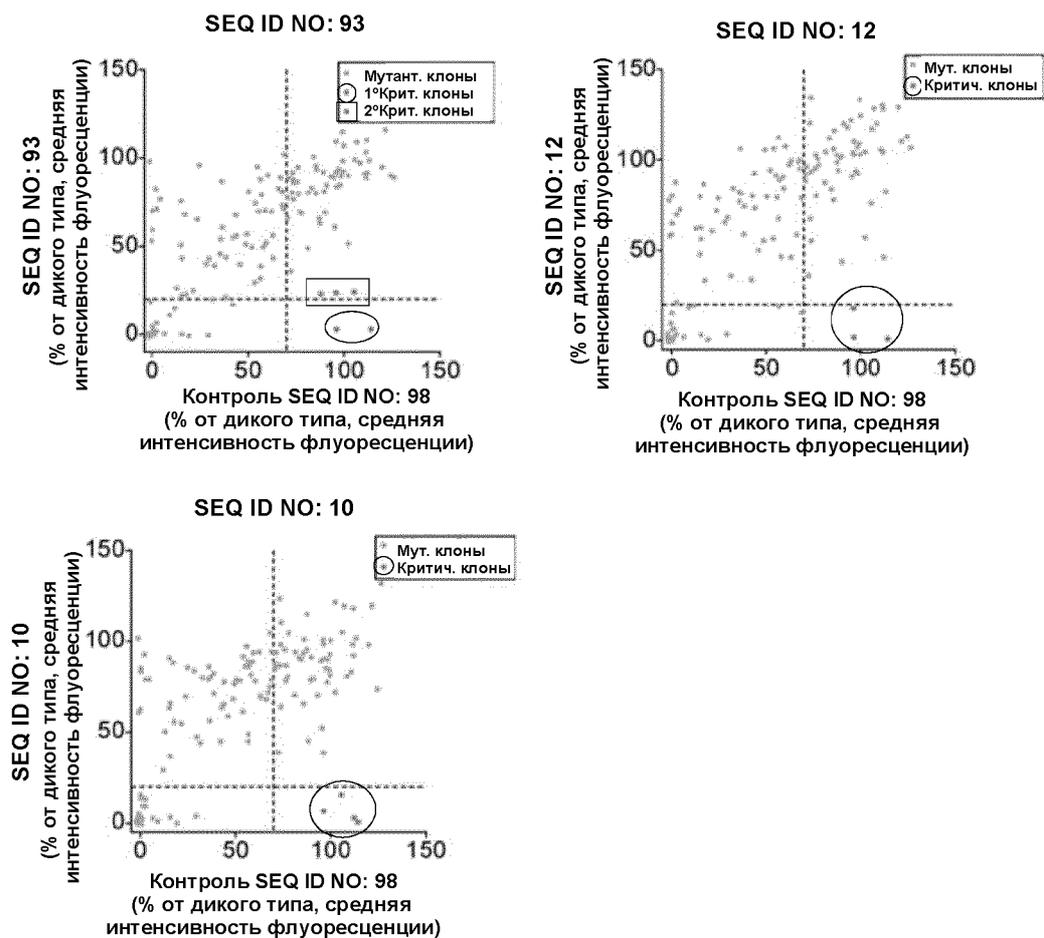


Фигура 7

Фигура 7А



Фигура 7В

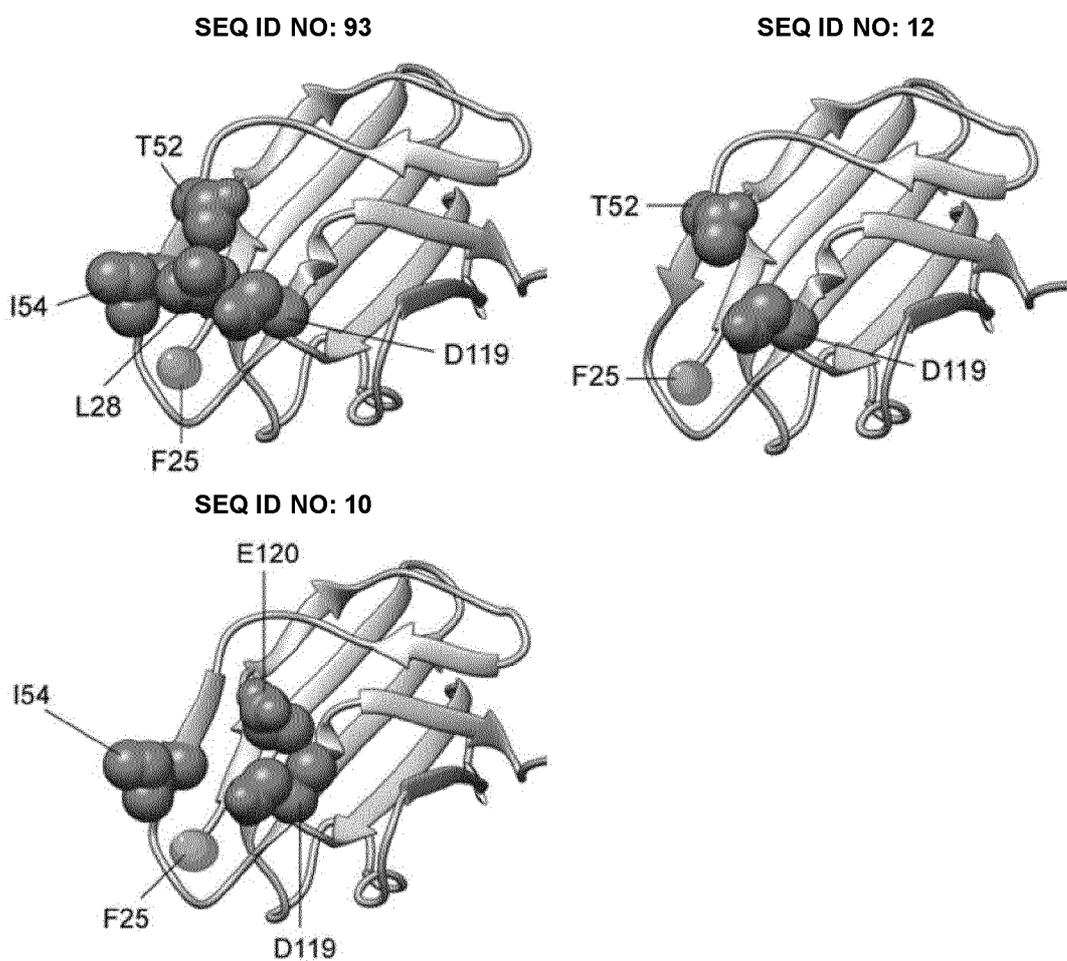


Фигура 7 продолж.

Фигура 7С

Реактивность связывания (% от дикого типа)				
Мутация	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 98
F25A	2.28 (0)	1.5 (0)	6.6 (1)	96.3 (41)
L28A	22.8 (2)	94.2 (10)	44.9 (2)	88.1 (11)
T52A	23.4 (9)	17.9 (13)	38.6 (13)	96.1 (13)
I54A	24 (0)	75.9 (28)	15.4 (3)	105.5 (22)
D119A	2.8 (3)	1 (1)	0.6 (0)	114.3 (14)
E120A	91.5 (9)	46.6 (2)	2.9 (1)	112.3 (6)

Фигура 7D



Фигура 8

