(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 035550 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.07.06

(21) Номер заявки
201690314

(22) Дата подачи заявки
2014.08.01

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С КОМПЛЕКСОМ hGARP/TGF-B1, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **13178958.8; 61/861,008; 14167425.9**
(32) **2013.08.01; 2013.08.01; 2014.05.07**
(33) **EP; US; EP**
(43) **2016.07.29**
(86) **PCT/EP2014/066650**
(87) **WO 2015/015003 2015.02.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮНИВЕРСИТЕ КАТОЛИК ДЕ ЛУВЭН (BE); ЛЮДВИГ ИНСТИТЬЮТ ФОР КЭНСЕР РИСЕРЧ ЛТД. (CH); АРДЖЕНКС БВБА (BE)

(72) Изобретатель:
Лукас Софи, Кули Пьерр, Куэнде Вилласур Юлиа, Дюмутье Лор, Рено Жан-Кристоф, Ван Де Вонинг Себастиан, Сондерс Майкл (BE), Де Хард Ханс (NL), Де Бук Гитте (BE)

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

(56) Rui Wang ET AL.: "GARP regulates the bioavailability and activation of TGF[beta]", Molecular biology of the cell, 1 March 2012 (2012-03-01), pages 1129-1139, XP055094855, United States DOI: 10.1091/mbc.E11-12-1018 Retrieved from the Internet: URL: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi ?artid=3302739&tool=pmcentrez&rendertype = abstract the whole document

JULIE STOCKIS ET AL.: "Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-Î2 on the surface of activated human Treg", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 39, no. 12, 1 December 2009 (2009-12-01), pages 3315-3322, XP055094846, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/eji.200939684 the whole document

EDWARDS J.P. ET AL.: "Regulation of the Expression of GARP/Latent TGF-1 Complexes on Mouse T Cells and Their Role in Regulatory T Cell and Th17 Differentiation", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 190, no. 11, 3 May 2013 (2013-05-03), pages 5506-5515, XP055147086, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1300199 page 5512, left-hand column, paragraph 1

ZHOU A.X. ET AL.: "GARP-TGF-Complexes Negatively Regulate Regulatory T Cell Development and Maintenance of Peripheral CD4+ T Cells In Vivo", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 190, no. 10, 10 April 2013 (2013-04-10), pages 5057-5064, XP055147087, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1300065 page 5063, last paragraph

TRAN D.Q. ET AL.: "GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF- on platelets and activated FOXP3+ regulatory T Cells", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 106, no. 32, 11 August 2009 (2009-08-11), pages 13445-13450, XP055021925, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0901944106 page 13449, right-hand column, paragraph 2 figures 1-3

WO-A1-2009073163

KARSTEN KRETSCHMER ET AL.: "Strong antigenic selection shaping the immunoglobulin heavy chain repertoire of B-1a lymphocytes in lambda 2-315 transgenic mice", EUR. J. IMMUNOL., vol. 32, 2 August 2002 (2002-08-02), pages 2317-2327, XP055146944, -& K Kretschmer ET AL.: "Immunoglobulin heavy chain variable region, partial [Mus musculus] AA019657", GenBank, 14 January 2003 (2003-01-14), XP055146951, Retrieved from the Internet: URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AA 019657 [retrieved on 2014-10-15] comprises 11/15 of the amino acids defined by SEQ ID NO: 3 and 9/13 amino acids defined by SEQ ID NO: 4

WO-A2-2005102387

WO-A2-2010001251

EP-A1-0799836

YINGYUN CAI ET AL.: "An immunotoxin targeting the gH glycoprotein of KSHV for selective killing of cells in the lytic phase of infection", ANTIVIRAL RESEARCH, ELSEVIER BV, NL, vol. 90, no. 3, 13 March 2011 (2011-03-13), pages 143-150, XP028091986, ISSN: 0166-3542, DOI: 10.1016/ J.ANTIVIRAL.2011.03.175 [retrieved on 2011-03-24] Light chain variable domain is 89% identical to SEQ ID NO: 9 -& Anonymous: "Mus musculus clone YC15 anti-KSHV gH immunoglobulin light chain variab - Nucleotide - NCBI", GenBank JF330319.1, 30 April 2011 (2011-04-30), XP055094869, Retrieved from the Internet: URL: http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JF330319.1 [retrieved on 2014-01-06]

WO-A2-2006085938

ROSEMARY J. AKHURST ET AL.: "Targeting the TGF[beta] signalling pathway in disease", NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, vol. 11, no. 10, 24 September 2012 (2012-09-24), pages 790-811, XP055094901, ISSN: 1474-1776, DOI: 10.1038/nrd3810

035550 B1

035550 B1

page 795, left-hand column - page 796, right-hand column table 1

RUDIKOFF S. ET AL.: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 79, no. 6, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP002986051, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979 the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, связывающимся с комплексом hGARP/TGF-β1, и к их применению.

035550 B1

035550 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к анти-GARP-белку человека, который ингибирует передачу сигнала TGF-β. Настоящее изобретение также относится к лечению иммунных расстройств и таких заболеваний, как злокачественная опухоль.

Уровень техники

После молекулярной идентификации первых опухолевых антигенов человека в ранние 1990-е гг. было проведено несколько клинических испытаний для оценки эффектов терапевтической вакцинации пациентов со злокачественными опухолями общими специфичными для опухолей антигенами (Boon, T. et al. Annu. Rev. Immunol. 2006, 24: 175-208). Свидетельства регрессии опухолей наблюдали примерно у 20% пациентов с объективными клиническими ответами у 5-10%. Таким образом, вакцинация специфичными для опухолей антигенами представляет собой новый многообещающий способ терапии для лечения злокачественной опухоли.

Необходимы методики повышения доли пациентов, которые отвечают на вакцинацию. Основным фактором, лимитирующим клиническую эффективность современных терапевтических вакцин против злокачественных опухолей, по-видимому, является не сама вакцина, а локальные факторы, контролирующие микроокружение опухоли, в котором должны работать противоопухолевые Т-клетки.

Регуляторные Т-клетки или Treg представляют собой подгруппу Т-лимфоцитов CD4+, специализированных на ингибировании иммунных ответов. Недостаточная функция Treg приводит к аутоиммунной патологии, тогда как чрезмерная функция Treg может ингибировать противоопухолевые иммунные ответы у пациентов со злокачественными опухолями. Точные механизмы, посредством которых Treg ингибируют иммунные ответы, полностью не выяснены.

Вследствие своих иммуносупрессорных функций Treg представляют собой потенциальные ингибиторы спонтанных или индуцированных вакциной противоопухолевых иммунных ответов. В мышиных моделях истощение Treg может улучшать иммунные ответы против экспериментальных опухолей (Colombo et al. Nat. Rev. Cancer 2007, 7: 880-887). Таким образом, направленные к мишени Treg у человека могут повышать эффективность иммунотерапии против злокачественной опухоли.

Так как авторы изобретения ранее показали, что активный TGF-β продуцируется Treg человека, а не другими типами Т-лимфоцитов человека (Stockis, J. et al. Eur. J. Immunol. 2009, 39:869-882), то TGF-β может представлять интерес в качестве мишени.

Однако не было обнаружено, что антитела против hTGF-β являются перспективными. Были проведены клинические испытания фазы 1 при фокально-сегментарном гломерулосклерозе (FSGS), идиопатическом легочном фиброзе (IPF) и злокачественной меланоме на поздней стадии или почечно-клеточной карциноме (RCC) (Lonning S et al. Current Pharmaceutical Biotechnology 2011, 12: 2176-2189). В зависимости от испытания наблюдали неблагоприятные явления у некоторых пациентов. Основными неблагоприятными реакциями, о которых сообщалось, заключались в развитии кератоакантомы (KA) и плоскоклеточной карциномы (SCC) у пациентов с меланомой. Вероятно, что поражения, вызванные KA или SCC, у пациентов с меланомой возникали из предзлокачественных клеток, пролиферация которых ингибируется эндогенным TGF-β (Lonning S. et al. Current Pharmaceutical Biotechnology 2011, 12: 2176-2189). Таким образом, основной проблемой, связанной с применением анти-TGF-β-антител в контексте злокачественной опухоли, является то, что они могут способствовать появлению новых неопластических поражений вследствие ингибирования подавляющего опухоли эффекта, оказываемого эндогенным TGF-β на предзлокачественные клетки.

Одной из целей изобретения является новая методика улучшения лечения злокачественных опухолей путем целенаправленного воздействия на Treg в отношении продукции ими TGF-β.

Ранее было показано, что продукция TGF-β жестко регулируется многостадийным процессом. Предшественник, называемый про-TGF-β1, гомодимеризуется перед расщеплением конвертазой пробелка фурином. Образуемый в результате продукт назван латентным TGF-β1, и в нем С-концевой фрагмент или зрелый TGF-β1 оказывается нековалентно связанным с N-концевым фрагментом, известным как ассоциированный с латентностью пептид или LAP. Такой латентный комплекс является неактивным, так как LAP препятствует связыванию зрелого TGF-β1 с его рецептором.

В настоящем изобретении авторы показали, что латентный TGF-β связывается с поверхностью Treg посредством трансмембранного белка GARP (преобладающие повторы гликопротеида А).

Таким образом, целью настоящего изобретения является новая методика целенаправленного воздействия на Treg, основанная на анти-GARP-белке, ингибирующем передачу сигнала TGF-β.

Сущность изобретения

Одной из целей изобретения является белок, связывающийся с белком, называемым "преобладающие повторы гликопротеида А" (GARP), в присутствии TGF-β. В одном варианте указанный белок связывается с GARP только в присутствии TGF-β. В другом варианте указанный белок связывается с GARP, когда GARP находится в комплексе с TGF-β. В другом варианте указанный белок связывается с комплексом GARP и TGF-β.

В одном варианте изобретения указанный белок представляет собой молекулу антитела, выбранную из группы, состоящей из целого антитела, гуманизированного антитела, одноцепочечного антитела, димерного одноцепочечного антитела, Fv, Fab, $F(ab)'_2$, дефукозилированного антитела, биспецифичного антитела, диантитела, триантитела, тетраантитела.

В другом варианте указанный белок представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из униантитела, доменного антитела и наноантитела.

В другом варианте указанный белок представляет собой миметик антитела, выбранный из группы, состоящей из аффиантитела, аффилина, аффитина, аднектина, атримера, эвазина, дарпина, антикалина, авимера, финомера, версатела и дуокалина.

Другой целью изобретения является белок, который описан выше, или белок, связывающий GARP и ингибирующий передачу сигнала TGF-β.

В одном варианте указанный белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с конформационным эпитопом, содержащим одну или несколько аминокислот GARP или эпитопа GARP, модифицированного в результате присутствия GARP в комплексе с латентным TGF-β.

В другом варианте указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно связывает одну или несколько аминокислот латентного TGF-β. В другом варианте указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает эпитоп, содержащий один или несколько остатков с 101 по 141 остатки GARP, которые указаны в последовательности SEQ ID NO: 1.

Другой целью изобретения является белок, имеющий вариабельную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере одну из следующих CDR:

VH-CDR1: GFSLTGYGIN (SEQ ID NO: 2) или GYGIN (SEQ ID NO: 52);

VH-CDR2: MIWSDGSTDYNSVLTS (SEQ ID NO: 3); and

VH-CDR3: DRNYYDYDGAMDY (SEQ ID NO: 4),

или любую CDR, имеющую аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 60% идентичностью с последовательностью SEQ ID NO: 2-4 или 52,

или имеющий вариабельную область легкой цепи, содержащую по меньшей мере одну из следующих CDR:

VL-CDR1: KASDHIKNWLA (SEQ ID NO: 5);

VL-CDR2: GATSLEA (SEQ ID NO: 6); и

VL-CDR3: QQYWSTPWT (SEQ ID NO: 7),

или любую CDR, имеющую аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 60% идентичностью с последовательностью SEQ ID NO: 5-7;

или вариабельная область тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну из следующих CDR:

VH-CDR1: SYYID (SEQ ID NO: 13);

VH-CDR2: RIDPEDGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 14);

VH-CDR3: NEWETVVVGDLMYEYEY (SEQ ID NO: 15),

или любую CDR, имеющую аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 60% идентичностью с последовательностью SEQ ID NO: 13-15;

или при этом вариабельная область легкой цепи содержит по меньшей мере одну из следующих CDR:

VL-CDR1: $QASQX_1IX_2SX_3LA$ (SEQ ID NO: 16),

где X_1 означает S или T, X_2 означает S или V, X_3 означает Y или F;

VL-CDR2: $X_1X_2SX_3X_4X_5T$ (SEQ ID NO: 17),

где X_1 означает G или R; X_2 означает A или T; X_3 означает R или I; X_4 означает L или P; X_5 означает Q или K;

VL-CDR3: $QQYX_1SX_2PX_3T$,

где X_1 означает D, A, Y или V; X_2 означает A, L или V; X_3 означает V или P (SEQ ID NO: 18);

или любую CDR, имеющую аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 60% идентичностью с последовательностью SEQ ID NO: 16-18.

В одном варианте вариабельная область тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну из следующих CDR:

VH-CDR1: GFSLTGYGIN (SEQ ID NO: 2) или GYGIN (SEQ ID NO: 52);

VH-CDR2: MIWSDGSTDYNSVLTS (SEQ ID NO: 3); и

VH-CDR3: DRNYYDYDGAMDY (SEQ ID NO: 4),

или любую CDR, имеющую аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей

мере 60% идентичностью с последовательностью SEQ ID NO: 2-4 или 52,

и вариабельная область легкой цепи содержит по меньшей мере одну из следующих CDR:

VL-CDR1: KASDHIKNWLA (SEQ ID NO: 5);

VL-CDR2: GATSLEA (SEQ ID NO: 6); и

VL-CDR3: QQYWSTPWT (SEQ ID NO: 7),

или любую CDR, имеющую аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 60% идентичностью с последовательностью SEQ ID NO: 5-7;

или вариабельная область тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну из следующих CDR:

VH-CDR1: SYYID (SEQ ID NO: 13);

VH-CDR2: RIDPEDGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 14);

VH-CDR3: NEWETVVVGDLMYEYEY (SEQ ID NO: 15);

или любую CDR, имеющую аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 60% идентичностью с последовательностью SEQ ID NO: 13-15,

и вариабельная область легкой цепи содержит по меньшей мере одну из следующих CDR:

VL-CDR1: $QASQX_1IX_2SX_3LA$ (SEQ ID NO: 16),

где X_1 означает S или T, X_2 означает S или V, X_3 означает Y или F;

VL-CDR2: $X_1X_2SX_3X_4X_5T$ (SEQ ID NO: 17),

где X_1 означает G или R; X_2 означает A или T; X_3 означает R или I; X_4 означает L или P; X_5 означает Q или K;

VL-CDR3: $QQYX_1SX_2PX_3T$,

где X_1 означает D, A, Y или V; X_2 означает A, L или V; X_3 означает V или P (SEQ ID NO: 18);

или любую CDR, имеющую аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 60% идентичностью с последовательностью SEQ ID NO: 16-18.

В другом варианте вариабельная область тяжелой цепи содержит следующие CDR: GFSLTGYGIN (SEQ ID NO: 2), MIWSDGSTDYNSVLTS (SEQ ID NO: 3), DRNYYDYDGAMDY (SEQ ID NO: 4), и вариабельная область легкой цепи содержит следующие CDR: KASDHIKNWLA (SEQ ID NO: 5), GATSLEA (SEQ ID NO: 6), QQYWSTPWT (SEQ ID NO: 7) или любую CDR, имеющую аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 60% идентичностью с указанными последовательностями SEQ ID NO: 2-7;

или вариабельная область тяжелой цепи содержит следующие CDR: GYGIN (SEQ ID NO: 52), MIWSDGSTDYNSVLTS (SEQ ID NO: 3), DRNYYDYDGAMDY (SEQ ID NO: 4), и вариабельная область легкой цепи содержит следующие CDR: KASDHIKNWLA (SEQ ID NO: 5), GATSLEA (SEQ ID NO: 6), QQYWSTPWT (SEQ ID NO: 7) или любую CDR, имеющую аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 60% идентичностью с указанными последовательностями SEQ ID NO: 52 и 3-7;

или при этом вариабельная область тяжелой цепи содержит следующие CDR: SYYID (SEQ ID NO: 13), RIDPEDGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 14) или NEWETVVVGDLMYEYEY (SEQ ID NO: 15); и вариабельная область легкой цепи содержит следующие CDR: $QASQX_1IX_2SX_3LA$ (SEQ ID NO: 16), где X_1 означает S или T, X_2 означает S или V, X_3 означает Y или F; $X_1X_2SX_3X_4X_5T$ (SEQ ID NO: 17), где X_1 означает G или R; X_2 означает A или T; X_3 означает R или I; X_4 означает L или P; X_5 означает Q или K; $QQYX_1SX_2PX_3T$, где X_1 означает D, A, Y или V; X_2 означает A, L или V; X_3 означает V или P (SEQ ID NO: 18); или любую CDR, имеющую аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 60% идентичностью с указанными последовательностями SEQ ID NO: 16-18.

В другом варианте аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 50, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 51, или аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 34, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи имеет одну из последовательностей SEQ ID NO: 35-39 или любую последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 60% идентичностью с указанными последовательностями SEQ ID NO: 8-9, 50-51 или 34-39.

Другой целью изобретения является белок, который определен в настоящем описании выше, связывающийся с эпитопом на полипептиде, имеющем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, узнаваемым антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, которая указана в SEQ ID NO: 8 или в SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи, которая указана в SEQ ID NO: 9 или в SEQ ID NO: 51, или антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, которая указана в SEQ ID NO: 34, и одну из вариабельных областей легкой цепи, которые указаны в SEQ ID NO: 35-39.

Другой целью изобретения является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, продуцируемый гибридомой, зарегистрированной с номером доступа LMBP 10246CB 30 мая 2013.

Другой целью изобретения является полинуклеотидная последовательность, кодирующая антитело

или антигенсвязывающий фрагмент, который описан выше.

Другой целью изобретения является экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид согласно пункту, который описан выше.

Другой целью изобретения является линия клеток гибридомы, продуцирующих антитело против GARP, зарегистрированное с номером доступа LMBP 10246CB 30 мая 2013.

Другой целью изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая белок, который описан выше, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Другой целью изобретения является фармацевтическая композиция, которая описана выше, для лечения связанного с TGF-β расстройства у пациента. В одном варианте связанное с TGF-β расстройство выбрано из группы, состоящей из воспалительных заболеваний, хронической инфекции, злокачественной опухоли, фиброза, сердечно-сосудистых заболеваний, цереброваскулярного заболевания (например, ишемического инсульта) и нейродегенеративных заболеваний.

В другом варианте фармацевтическая композиция, которая описана выше, предназначена для введения в комбинации с другим лечением злокачественной опухоли или другим иммунотерапевтическим средством, таким как противоопухолевая вакцина или иммуностимулирующее антитело.

В другом варианте фармацевтическая композиция, которая описана выше, предназначена для введения в качестве иммуностимулирующего антитела для лечения пациентов со злокачественными опухолями.

Определения.

В настоящем изобретении следующие термины имеют следующие значения.

"Антитело" или "иммуноглобулин". В используемом в настоящем описании смысле термин "иммуноглобулин" включает полипептид, имеющий сочетание двух тяжелых и двух легких цепей, независимо от того, обладает ли он подходящей специфичной иммунореактивностью. Термин "антитела" относится к таким сборным конструкциям, которые обладают значительной известной специфичной иммунореактивной активностью по отношению к представляющему интерес антигену (например, GARP человека). Термин "GARP-антитела" используют в настоящем описании по отношению к антителам, которые проявляют иммунологическую специфичность по отношению к белку GARP человека. Как поясняется в настоящем описании, "специфичность" по отношению к GARP человека не исключает перекрестную реакцию с видами, гомологичными GARP. Кроме того, также не исключаются антитела, узнающие эпитоп, охватывающий остатки белка GARP и остаток белка TGF-β. Антитела и иммуноглобулины содержат легкие и тяжелые цепи при наличии или в отсутствие межцепочечной ковалентной связи между ними. Основные структуры иммуноглобулинов в системах позвоночных относительно хорошо изучены. Общий термин "иммуноглобулин" включает пять отдельных классов антитела, которые можно отличить биохимически. Все пять классов антител входят в объем настоящего изобретения, а следующее далее обсуждение, в общем, будет направлено на класс молекул иммуноглобулина IgG. Что касается IgG, иммуноглобулины содержат две идентичных легких полипептидных цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 Да и две идентичных тяжелых цепи с молекулярной массой 53000-70000 Да. Четыре цепи связаны дисульфидными связями в Y-конфигурации, в которой легкие цепи захватывают тяжелые цепи, начиная с горловины Y и продолжая на протяжении вариабельной области. Легкие цепи антитела классифицируют как κ и λ. Каждый класс тяжелой цепи может быть связан либо с κ, либо с λ легкой цепью. В общем, легкие и тяжелые цепи ковалентно связаны друг с другом, и "хвостовые" области двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда иммуноглобулины образуются либо в гибридах, либо в В-клетках, либо в генетически сконструированных клетках-хозяевах. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности идут от N-конца на разветвленных в виде вилки концах Y-конфигурации к С-концу внизу каждой цепи. Специалистам в данной области будет понятно, что тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ, μ, α, δ, ε), и среди них некоторые подклассы (например, γ1-γ4). Природа такой цепи определяет "класс" антитела как IgG, IgM, IgA IgG или IgE соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулина, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д., хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию.

Модифицированные варианты каждого из таких классов и изотипов легко может отличить специалист в данной области с учетом настоящего описания, и, соответственно, такие варианты входят в объем настоящего изобретения. Как указано выше, вариабельная область антитела позволяет антителу избирательно узнавать и специфично связывать эпитопы на антигенах. То есть VL-домен и VH-домен антитела объединяются с образованием вариабельной области, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий участок. Такая состоящая из четырех частей структура антитела образует антигенсвязывающий участок, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно, антигенсвязывающий участок определяется тремя определяющими комплементарность областями (CDR) на каждой из цепей VH и VL.

"Изолированное антитело". В используемом в настоящем описании смысле "изолированное антитело" представляет собой антитело, которое было отделено и/или извлечено из компонентов его природного окружения. Загрязняющие компоненты из его природного окружения являются материалами, которые

могут мешать диагностическим или терапевтическим применениям антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые компоненты. В предпочтительных вариантах антитело очищают (1) более чем до 95 мас.% антитела, как определяют способом по Лоури, и наиболее предпочтительно более чем на 99 мас.%; (2) в такой степени, которая достаточна для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности при использовании секвенатора с вращающимся стаканом; или (3) до гомогенности, которую выявляют в SDS-ПААГ в восстанавливающих или не восстанавливающих условиях и с использованием окрашивания Кумасси синим или предпочтительно серебром. Изолированное антитело включает антитело in situ в рекомбинантных клетках, так как по меньшей мере один компонент из природного окружения антитела не будет присутствовать. Однако обычно изолированное антитело может быть получено в результате по меньшей мере одной стадии очистки.

"Аффинные варианты". В используемом в настоящем описании смысле термин "аффинный вариант" относится к варианту антитела, который имеет одно или несколько изменений в аминокислотной последовательности по сравнению с эталонным GARP-антителом, при этом аффинный вариант проявляет измененную аффинность по отношению к белку GARP человека или комплексу GARP/TGF-β по сравнению с эталонным антителом. Обычно аффинные варианты будут проявлять улучшенную аффинность по отношению к GARP человека или комплексу GARP человека/TGF-β по сравнению с эталонным GARP-антителом. Улучшение может заключаться либо в более низком значении KD по отношению к GARP человека, либо в более быстрой скорости распада, или в более быстрой скорости диссоциации GARP человека, либо в изменении картины перекрестной реактивности с гомологами GARP животных, отличных от человека. Аффинные варианты обычно имеют одно или несколько изменений в аминокислотной последовательности в CDR по сравнению с эталонным GARP-антителом. Такие замены могут приводить к замене исходной аминокислоты, присутствующей в данном положении в CDR, другим аминокислотным остатком, который может представлять собой остаток встречающейся в природе аминокислоты или остаток не встречающейся в природе аминокислоты. Аминокислотные замены могут быть консервативными или неконсервативными.

"Связывающий участок". В используемом в настоящем описании смысле термин "связывающий участок" содержит область полипептида, которая ответственна за избирательное связывание с представляющим интерес антигеном-мишенью (например, GARP человека). Связывающие домены или связывающие области составляют по меньшей мере один связывающий участок. Примеры связывающих доменов включают вариабельный домен антитела. Молекулы антитела согласно изобретению могут содержать один антигенсвязывающий участок или несколько (например, два, три или четыре) антигенсвязывающих участков.

"Консервативная аминокислотная замена". В используемом в настоящем описании смысле "консервативная аминокислотная замена" означает замену, при которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), β-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, несущественный аминокислотный остаток в полипептиде иммуноглобулина может быть заменен другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В другом варианте последовательность аминокислот может быть заменена структурно сходной последовательностью, которая отличается порядком и/или составом представителей семейств боковых цепей.

"Химерный". В используемом в настоящем описании смысле "химерный" белок содержит первую аминокислотную последовательность, связанную со второй аминокислотной последовательностью, с которой она не связана в природе. Аминокислотные последовательности в природе могут существовать в виде отдельных белков, которые сводят вместе в слитый полипептид, или они могут в природе существовать в одном и том же белке, но их помещают в новом порядке в слитом полипептиде. Химерный белок может быть создан, например, в результате химического синтеза или в результате создания и трансляции полинуклеотида, в котором кодируются области пептида в требуемой взаимосвязи. Примеры химерных GARP-антител включают слитые белки, содержащие полученные от верблюдовых домены VH и VL или их гуманизированные варианты, слитые с константными доменами антитела человека, например IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

"CDR". В используемом в настоящем описании смысле термин "CDR" или "определяющая комплементарность область" означает не следующие друг за другом антигенсвязывающие участки, находящиеся в вариабельной области полипептидов и тяжелой и легкой цепей. Такие особые области были описаны в публикациях Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977), Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991), Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) и MacCallum et al., J. Mol. Biol.

262:732-745 (1996), при этом определения границ включают перекрывания и подгруппы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, определенные в каждой из указанных выше публикаций, приведены для сравнения. Предпочтительно термин "CDR" означает CDR, которая определена Кабатом на основе сравнений последовательностей.

Таблица 1

Определения CDR

	Определения CDR		
	Kabat (1)	Chothia (2)	MacCallum (3)
VH CDR1	31-35	26-32	30-35
VH CDR2	50-65	53-55	47-58
VH CDR3	95-102	96-101	93-101
VL CDR1	24-34	26-32	30-36
VL CDR2	50-56	50-52	46-55
VL CDR3	89-97	91-96	89-96

(1) Нумерация остатков в соответствии с номенклатурой Kabat с соавт., выше.

(2) Нумерация остатков в соответствии с номенклатурой Chothia с соавт., выше.

(3) Нумерация остатков в соответствии с номенклатурой MacCallum с соавт., выше.

"Домен CH2". В используемом в настоящем описании смысле термин "домен CH2" включает область молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, примерно от остатка 244 до остатка 360 антитела при использовании обычных схем нумерации (остатки 244-360, система нумерации Kabat; и остатки 231-340, система нумерации EU, Kabat E.A. et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest. Bethesda, US Department of Health and Human Services, NIH. 1991). Домен CH2 является уникальным в том, что он не спарен близко с другим доменом. Наоборот, два N-связанных разветвленных углеводных цепи встроены между двумя доменами CH2 интактной нативной молекулы IgG. Также убедительно подтверждено, что домен CH3 простирается от домен CH2 к C-концу молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

"Полученный от верблюдовых". В некоторых предпочтительных вариантах молекулы GARP-антител согласно изобретению содержат каркасные аминокислотные последовательности и/или аминокислотные последовательности CDR, полученные из обычного антитела верблюдовых, образованного после активной иммунизации верблюдового животного антигеном GARP. Однако GARP-антитела, содержащие полученные от верблюдовых аминокислотные последовательности, могут быть сконструированы так, чтобы они содержали последовательности каркаса и/или константной области, полученные из аминокислотной последовательности человека или другого вида млекопитающих, отличного от верблюдовых. Например, в GARP-антитела могут быть включены каркасная область, область тяжелой цепи и/или шарнирная область человека или примата, отличного от человека. В одном варианте одна или несколько аминокислот животного, отличного от верблюдовых, может присутствовать в каркасной области "полученного от верблюдовых" GARP-антитела, например каркасная аминокислотная последовательность верблюдовых может содержать одну или несколько аминокислотных мутаций, когда присутствует соответствующий аминокислотный остаток человека или примата, отличного от человека. Кроме того, полученные от верблюдовых домены VH и VL или их гуманизированные варианты могут быть связаны с константными доменами антител человека, чтобы получить химерную молекулу, которая подробно описана в настоящей публикации.

"Полученный из". В используемом в настоящем описании смысле термин "полученный из" указанного белка (например, GARP-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) относится к происхождению полипептида. В одном варианте полипептид или аминокислотная последовательность, которая получена из конкретного исходного полипептида, представляет собой последовательность CDR или родственную ей последовательность. В одном варианте аминокислотная последовательность, которая получена из конкретного исходного полипептида, не является непрерывной. Например, в одном варианте одна, две, три, четыре, пять или шесть CDR получены из исходного антитела. В одном варианте полипептид или аминокислотная последовательность, которая получена из конкретного исходного полипептида или аминокислотной последовательности, имеет аминокислотную последовательность, которая, по существу, идентична исходной последовательности или ее области, при этом область состоит по меньшей мере из 3-5 аминокислот, по меньшей мере из 5-10 аминокислот, по меньшей мере из 10-20 аминокислот, по меньшей мере из 20-30 аминокислот или по меньшей мере из 30-50 аминокислот, или которая в противном случае может быть идентифицирована специалистом в данной области, как имеющая происхождение из исходной последовательности. В одном варианте одну или несколько последовательностей CDR, полученных из исходного антитела, изменяют так, чтобы получить варианты последовательностей CDR, например аффинные варианты, при этом варианты последовательностей CDR сохраняют активность в связывании GARP.

"Диантитела". В используемом в настоящем описании смысле термин "диантитела" относится к небольшим фрагментам антител, полученным посредством конструирования фрагментов sFv (см. абзац, посвященный sFv) с короткими линкерами (примерно 5-10 остатков) между доменами VH и VL так, чтобы добиться межцепочечного, но не внутрицепочечного спаривания V-доменов, с получением в результате бивалентного фрагмента, т.е. фрагмента, имеющего два антигенсвязывающих участка. Биспецифичные диантитела представляют собой гетеродимеры из двух "перекрестных" sFv-фрагментов, в которых домены VH и VL двух антител присутствуют в разных полипептидных цепях. Диантитела более полно описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161 и Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 6444-6448 (1993).

"Сконструированный". В используемом в настоящем описании смысле термин "сконструированный" включает обработку молекул нуклеиновых кислот или полипептидов с применением способов синтеза (например, основанных на рекомбинации методик, синтеза пептидов in vitro, ферментативного или химического связывания пептидов или определенного сочетания указанных способов). Предпочтительно конструируют антитела согласно изобретению, включая, например, гуманизированные и/или химерные антитела и антитела, которые были сконструированы для улучшения одного или нескольких свойств, таких как связывание антигена, стабильность/время полужизни или эффекторная функция.

"Эпитоп". В используемом в настоящем описании смысле термин "эпитоп" относится к специфичному расположению аминокислот, находящихся в пептиде или белке или белках, с которыми связывается антитело. Эпитопы часто состоят из химически активной поверхностной группы молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и имеют специфичные трехмерные структурные характеристики, а также специфичные характеристики заряда. Эпитопы могут быть линейными или конформационными, т.е. включающими в себя две или более последовательностей аминокислот в разных областях антигена, которые не обязательно должны следовать друг за другом.

"Каркасная область". Термин "каркасная область" или "FR-область" в используемом в настоящем описании смысле включает аминокислотные остатки, которые являются частью вариабельной области, но не являются частью CDR (например, при использовании определения CDR согласно Kabat). Таким образом, каркас вариабельной области имеет длину примерно 100-120 аминокислот, но включает только аминокислоты, находящиеся вне CDR. В случае конкретного примера вариабельной области тяжелой цепи и CDR, которые определены согласно нумерации Kabat с соавт., каркасная область 1 соответствует домену вариабельной области, охватывающему аминокислоты 1-30; каркасная область 2 соответствует домену вариабельной области, охватывающему аминокислоты 36-49; каркасная область 3 соответствует домену вариабельной области, охватывающему аминокислоты 66-94, и каркасная область 4 соответствует домену вариабельной области от аминокислоты 103 до конца вариабельной области. Каркасные области для легкой цепи подобным образом разделены каждой из CDR вариабельной области легкой цепи. Подобным образом, при использовании определения границ CDR согласно Chothia с соавт. или McCallum с соавт., границы каркасных областей разделены соответствующими концами CDR, как описано выше. В предпочтительных вариантах CDR определяют согласно определению Kabat. Во встречающихся в природе антителах шесть CDR, присутствующих в каждом мономерном антителе, являются короткими, прерывистыми последовательностями аминокислот, которые располагаются специфичным образом, образуя антигенсвязывающий участок, когда антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водной среде. В случае остальной части вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей наблюдается меньшая межмолекулярная вариабельность аминокислотной последовательности, и такую часть называют каркасными областями. Каркасные области, в основном, принимают конформацию β-слоя, CDR образуют петли, которые соединяют и в некоторых случаях образуют часть структуры β-слоев. Таким образом, указанные каркасные области действуют, образуя скелет, который обеспечивает расположение шести CDR в правильной ориентации посредством межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий участок, образованный определенным образом расположенными CDR, определяет комплементарность поверхности эпитопу на иммунореактивном антигене. Такая комплементарная поверхность обеспечивает нековалентное связывание антитела с эпитопом иммунореактивного антигена. Положение CDR может быть легко идентифицировано специалистом в данной области.

"Фрагмент". В используемом в настоящем описании смысле термин "фрагмент" относится к части или области антитела или цепи антитела, содержащей меньше аминокислотных остатков, чем интактное или полное антитело или цепь антитела. Термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидному фрагменту иммуноглобулина или антитела, который связывает антиген или конкурирует с интактным антителом (т.е. с интактным антителом, из которого они получены) за связывание антигена (т.е. специфичное связывание с GARP человека). В используемом в настоящем описании смысле термин "фрагмент" молекулы антитела включает антигенсвязывающие фрагменты антител, например вариабельный домен легкой цепи антитела (VL), вариабельный домен тяжелой цепи антитела (VH), одноцепочечное антитело (scFv), $F(ab')_2$-фрагмент, Fab-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, фрагмент однодоменного антитела (DAb), антитело с одним плечом (моновалентное), диантитела или любая антигенсвязывающая молекула, образованная в результате сочетания, сборки или конъюгации таких антигенсвязы-

вающих фрагментов. Фрагменты могут быть получены, например, в результате химической или ферментативной обработки интактного или полного антитела или цепи антитела или способами, основанными на рекомбинации.

"Fv". В используемом в настоящем описании смысле термин "Fv" означает минимальный фрагмент антитела, который содержит полный участок распознавания и связывания антигена. Такой фрагмент состоит из димера одного вариабельного домена тяжелой цепи и одного вариабельного домена легкой цепи в тесной нековалентной ассоциации. В результате фолдинга таких двух доменов возникают шесть гипервариабельных петель (по три петли из каждой H- и L-цепи), которые обеспечивают аминокислотные остатки для связывания антигена и придают специфичность в связывании антигена с антителом. Однако даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичные по отношению к антигену) обладает способностью узнавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем полный участок связывания.

"Область тяжелой цепи". В используемом в настоящем описании смысле термин "область тяжелой цепи" включает аминокислотные последовательности, полученные из константных доменов тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий область тяжелой цепи, содержит по меньшей мере одно из следующего: домен CH1, шарнирный домен (например, верхнюю, среднюю и/или нижнюю область шарнира), домен CH2, домен CH3 или их вариант или фрагмент. В одном варианте связывающая молекула согласно изобретению может содержать Fc-область тяжелой цепи иммуноглобулина (например, шарнирную часть, домен CH2 и домен CH3). В другом варианте связывающая молекула согласно изобретению не имеет, по меньшей мере, области константного домена (например, весь или часть домена CH2). В некоторых вариантах по меньшей мере один и предпочтительно все константные домены получены из тяжелой цепи иммуноглобулина человека. Например, в одном предпочтительном варианте область тяжелой цепи содержит полный шарнирный домен человека. В других предпочтительных вариантах область тяжелой цепи содержит полностью человеческую Fc-область (например, последовательности шарнира доменов CH2 и CH3 из иммуноглобулина человека). В некоторых вариантах составляющие константные домены области тяжелой цепи происходят из разных молекул иммуноглобулина. Например, область тяжелой цепи полипептида может содержать домен CH2, полученные из молекулы IgG1, и область шарнира, полученную молекулы IgG3 или IgG4. В других вариантах константные домены представляют собой химерные домены, содержащие области разных молекул иммуноглобулина. Например, шарнир может содержать первую область из молекулы IgG1 и вторую область из молекулы IgG3 или IgG4. Как указано выше, специалисту в данной области будет понятно, что константные домены области тяжелой цепи могут быть модифицированы так, чтобы они отличались по аминокислотной последовательности от встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина (дикого типа). То есть полипептиды согласно изобретению, раскрытые в настоящем описании, могут иметь изменения или модификации в одном или нескольких константных доменах тяжелой цепи (CH1, шарнир, CH2 или CH3) и/или в константных доменах легкой цепи (CL). Примеры модификаций включают добавления, делеции или замены одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких доменах.

"Шарнирная область". В используемом в настоящем описании смысле термин "шарнирная область" включает область молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен CH1 с доменом CH2. Такая шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибком, позволяя в результате этого независимо двигаться двум N-концевым антигенсвязывающим областям. Шарнирные области могут быть подразделены на три отдельных домена: верхний, средний и нижний домены шарнира (Roux et al. J. Immunol. 1998, 161: 4083).

Термины "гипервариабельная петля" и "определяющая комплементарность область" не являются строгими синонимами, так как гипервариабельные петли (HV) определяют на основе структуры, тогда как определяющие комплементарность области (CDR) определяют на основе вариабельности последовательностей (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1983) и границы HV и CDR могут быть разными в некоторых доменах VH и VL. CDR VL- и VH-доменов обычно можно определять как содержащие следующие аминокислоты: остатки 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) и 89-97 (CDRL3) в вариабельном домене легкой цепи, и остатки 31-35 или 31-35b (CDRH1), 50-65 (CDRH2) и 95-102 (CDRH3) в вариабельном домене тяжелой цепи; (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Таким образом, HV могут находиться в соответствующих CDR, и указания в настоящем описании на "гипервариабельные петли" доменов VH и VL следует интерпретировать как также охватывающие соответствующие CDR, и наоборот, если не указано иное. Более высоко консервативные области вариабельных доменов называют каркасной областью (FR), как определено ниже. Каждый их вариабельных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR (FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно), главным образом принимающих конфигурацию β-слоя, связанных тремя гипервариабельными петлями. Гипервариабельные петли в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью FR и с гипервариабельными петлями их другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего участка антител. Структурный анализ антител выявил взаимосвязь между последовательностью и формой участка связывания, образуемого определяющими

комплементарность областями (Chothia et al., J. Mol. Biol. 227: 799-817 (1992)); Tramontano et al., J. Mol. Biol, 215: 175-182 (1990)). Несмотря на высокую вариабельность последовательностей, пять из шести петель имеют только небольшой репертуар конфигураций основной цепи, называемых "каноническими структурами". Такие конформации, во-первых, определяются длиной петель, и во-вторых, присутствием ключевых остатков в некоторых положениях в петлях и в каркасных областях, которые определяют конформацию посредством их упаковки, образования водородных связей или способностью принимать необычные конформации основной цепи.

"Гуманизирующие замены". В используемом в настоящем описании смысле термин "гуманизирующие замены! относится к аминокислотным заменам, при которых аминокислотный остаток, присутствующий в конкретном положении в VH- или VL-домене GARP-антитела (например, полученного от верблюдовых GARP-антитела), заменяют аминокислотным остатком, который встречается в эквивалентном положении в VH- или VL-домене человека. Эталонный VH- или VL-домен человека может представлять собой VH- или VL-домен, кодируемый зародышевой линией человека, и в таком случае заменяющие остатки могут быть названы "заменами зародышевой линии". Гуманизирующие/приводящие к зародышевой линии замены могут быть осуществлены в каркасных областях и/или CDR GARP-антитела, которое определено в настоящем описании.

"Высокая гомология в сравнении с человеком". Антитело, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), будут считаться имеющим гомологию с доменами человека, если домены VH и домены VL, вместе взятые, имеют по меньшей мере 90% идентичность аминокислотной последовательности с наиболее совпадающими последовательностями VH и VL зародышевой линии человека. Антитела, имеющие высокую гомологию с антителами человека, могут включать антитела, содержащие VH- и VL-домены нативных антител животных, отличных от человека, которые имеют достаточно высокую идентичность последовательностей в % с последовательностями зародышевой линии человека, включая, например, антитела, содержащие VH- и VL-домены обычных антител верблюдовых, а также сконструированные, особенно гуманизированные, варианты таких антител, а также "полностью человеческие" антитела. В одном варианте VH-домен антитела с высокой гомологией по отношению к человеку может иметь идентичность аминокислотной последовательности или гомологию последовательности, составляющую 80% или больше, с одним или несколькими VH-доменами человека на протяжении каркасных областей FR1, FR2, FR3 и FR4. В других вариантах идентичность аминокислотных последовательностей или гомология последовательностей между VH-доменом полипептида согласно изобретению и наиболее совпадающей последовательностью VH-домена зародышевой линии человека может составлять 85% или больше, 90% или больше, 95% или больше, 97% или больше или вплоть до 99% или даже 100%. В одном варианте VH-домен антитела с высокой гомологией по отношению к антителу человека может содержать одно или несколько (например, от 1 до 10) несовпадений аминокислотной последовательности в каркасных областях FR1, FR2, FR3 и FR4 по сравнению с наиболее совпадающей последовательностью VH человека. В другом варианте VL-домен антитела с высокой гомологией по отношению к антителу человека может иметь идентичность последовательности или гомологию последовательности 80% или больше с одним или несколькими доменами VL человека на протяжении каркасных областей FR1, FR2, FR3 и FR4. В других вариантах идентичность аминокислотных последовательностей или гомология последовательностей между VL-доменом полипептида согласно изобретению и наиболее совпадающей последовательностью VL-домена зародышевой линии человека может составлять 85% или больше, 90% или больше, 95% или больше, 97% или больше или вплоть до 99% или даже 100%.

В одном варианте VL-домен антитела с высокой гомологией по отношению к антителу человека может содержать одно или несколько (например, от 1 до 10) несовпадений аминокислотной последовательности на протяжении каркасных областей FR1, FR2, FR3 и FR4 по сравнению с наиболее совпадающей последовательностью VL человека. Перед анализом идентичности последовательностей в процентах между антителом с высокой гомологией по отношению к антителу человека и VH и VL зародышевой линии человека могут быть определены канонические укладки, которые позволяют осуществить идентификацию семейства участков зародышевой линии человека с идентичным сочетанием канонических укладок для H1 и H2 или L1 и L2 (и L3). Затем выбирают представителя семейства зародышевой линии человека, который имеет наиболее высокую степень гомологии последовательности с вариабельной областью представляющего интерес антитела для оценки гомологии последовательностей. Определение канонических классов гипервариабельных петель L1, L2, L3, H1 и H2 согласно Chothia может быть осуществлено с использованием средств биоинформатики, общедоступных на веб-странице www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html.page. Выходные данные программы показывают требования к ключевым остаткам в файле данных. В таких файлах данных показаны положения ключевых остатков с допустимыми аминокислотами в каждом положении. Последовательность вариабельной области представляющего интерес антитела приводят в виде вводимых данных и сначала выравнивают с консенсусной последовательностью антитела, чтобы ввести схему нумерации согласно Kabat. Для анализа канонических укладов применяют набор матриц ключевых остатков, полученных автоматизированным способом, разработанным Martin и Thornton (Martin et al., J. Mol. Biol. 263: 800-815 (1996)). В случае известного

конкретного V-участка зародышевой линии человека, в котором использовано такое же сочетание канонических укладок для H1 и H2 или L1 и L2 (и L3), может быть определен наилучшим образом совпадающий представитель семейства в отношении гомологии последовательностей. С использованием средств биоинформатики может быть определена идентичность последовательностей в процентах между аминокислотными последовательностями каркаса VH- и VL-доменов представляющего интерес антитела и соответствующими последовательностями, кодируемыми в зародышевой линии человека, но также можно применять фактически ручное выравнивание последовательностей. Последовательности иммуноглобулинов человека могут быть идентифицированы в нескольких базах данных о белках, таких как VBase (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) или база данных Pluckthun/Honegger (http://www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines). Чтобы сравнить последовательности человека с V-областями VH- или VL-доменов представляющего интерес антитела, можно использовать алгоритм выравнивания последовательностей, такой как алгоритм, доступный на веб-сайтах, подобных www.expasy.ch/tools/#align, но также можно осуществить выравнивание вручную с использованием ограниченного набора последовательностей. Выбирают последовательности легкой и тяжелой цепей зародышевой линии человека из семейств с таким же сочетанием канонических укладок и с наиболее высокой степенью гомологии с каркасными областями 1, 2, и 3 каждой цепи и сравнивают с представляющей интерес вариабельной областью; также проверяют FR4 по сравнению с областями JH и JK или JL зародышевой линии человека. Следует обратить внимание, что при вычислении общей гомологии последовательностей в процентах остатки FR1, FR2 и FR3 оценивают, используя наиболее совпадающую последовательность из семейства зародышевой линии человека с идентичным сочетанием канонических укладок. Оценивают только остатки, которые отличаются от наиболее совпадающего или других представителей того же семейства с таким же сочетанием канонических укладок (NB - исключая любые кодируемые праймерами различия). Однако в целях гуманизации остатки в каркасных областях, идентичных представителям других семейств зародышевой линии человека, которые не имеют такого же сочетания канонических укладок, могут считаться "человеческими", несмотря на тот факт, что их оценивают как "негативные" в соответствии с жесткими условиями, описанными выше. Такое допущение основано на подходе "смешать и сопоставить" для гуманизации, при котором каждый из FR1, FR2, FR3 и FR4 отдельно сравнивают с наилучшим образом совпадающей с ними последовательностью зародышевой линии человека, поэтому гуманизированная молекула содержит сочетание разных FR, как было сделано Qu и соавт. (Qu et al., Clin. Cancer Res. 5: 3095-3100 (1999)) и Ono и соавт. (Ono et al., Mol. Immunol. 36: 387-395 (1999)). Границы индивидуальных каркасных областей могут быть определены с использованием схемы нумерации IMGT, которая представляет собой адаптированную схему нумерации Chothia (Lefranc et al., NAR 27: 209-212 (1999); http://im.gt.cines.fr). Антитела с высокой гомологией в сравнении с человеком могут содержать гипервариабельные петли или CDR, имеющие человеческие или подобные человеческим канонические укладки, которые подробно обсуждаются ниже. В одном варианте по меньшей мере одна гипервариабельная петля или CDR в любом домене VH или домене VL антитела с высокой гомологией в сравнении с человеком может быть получена или может происходить из домена VH или VL антитела животного, отличного от человека, например, обычного антитела из вида Camelidae, и тем не менее иметь предполагаемую или действительную структуру канонической укладки, которая, по существу, идентична канонической структуре укладки, которая встречается в антителах человека. В данной области хорошо установлено, что хотя первичные аминокислотные последовательности гипервариабельных петель, присутствующих и в доменах VH, и в доменах VL, кодируемых в зародышевой линии человека, по определению являются высоко вариабельными, все гипервариабельные петли, за исключением CDR H3 домена VH, принимают только несколько отдельных структурных конфигураций, называемых каноническими укладками (Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Tramontano et al. Proteins 6: 382-94 (1989)), которые зависят как от длины гипервариабельной петли, так и от наличия так называемых канонических аминокислотных остатков (Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Фактические канонические структуры гипервариабельных петель в интактных доменах VH или VL могут быть определены с использованием структурного анализа (например, рентгеновской кристаллографии), но также можно предсказать каноническую структуру на основе ключевых аминокислотных остатков, которые характерны для конкретной структуры (дополнительно обсуждаемых ниже). По существу, конкретная картина остатков, которые определяют каждую каноническую структуру, создает "опознавательный признак", который позволяет узнавать каноническую структуру в гипервариабельных петлях домена VH или VL с неизвестной структурой; поэтому канонические структуры можно прогнозировать на основе только первичной аминокислотной последовательности. Прогнозируемые структуры канонической укладки для гипервариабельных петель любой данной последовательности VH или VL в антителе с высокой гомологией в сравнении с человеком можно анализировать, используя алгоритмы, которые общедоступны на сайтах

www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html,

www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/antibody.html и

www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines/Vbase_hVk.html.

Указанные средства позволяют выравнивать запрашиваемые последовательности VH или VL с по-

следовательностями доменов VH или VL человека с известной канонической структурой и предсказывать каноническую структуру гипервариабельных петель запрашиваемой последовательности. В случае домена VH петли H1 и H2 можно оценить как имеющие каноническую структуру укладки, "по существу идентичную" канонической структуре укладки, которая, как известно, встречается в антителах человека, если, по меньшей мере, удовлетворяется первый и предпочтительно оба следующих критерия:

1) идентичная длина, определяемая по количеству остатков, с наиболее близко совпадающим классом канонической структуры у человека;

2) по меньшей мере 33% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 50% идентичность с ключевыми аминокислотными остатками, описанными для соответствующих классов канонической структуры H1 и H2 человека (следует обратить внимание, что в целях указанного выше анализа петли H1 и H2 обрабатывают по отдельности и каждую сравнивают с ее наиболее близко совпадающим классом канонической структуры у человека). Указанный выше анализ основан на прогнозировании канонической структуры петель H1 и H2 представляющего интерес антитела. Если фактические структуры петель H1 и H2 представляющего интерес антитела известны, например, на основе рентгеновской кристаллографии, то петли H1 и H2 в представляющем интерес антителе также можно оценить как имеющие каноническую структуру укладки, "по существу, идентичную" канонической структуре укладки, которая, как известно, встречается в антителах человека, если длина петли отличается от длины наиболее близко совпадающего класса канонической структуры у человека (обычно + 1 или +2 аминокислоты), но фактическая структура петель H1 и H2 в представляющем интерес антителе совпадает со структурой канонической укладки у человека. Ключевые аминокислотные остатки, имеющиеся в классах канонических структур у человека в первой и второй гипервариабельных петлях доменов VH человека (H1 и H2), описаны в публикации Chothia et al., J. Mol. Biol. 227: 799-817 (1992), содержание которой включено в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме. В частности, в табл. 3 на стр. 802 в публикации Chothia и соавт., которая специально включена в настоящее описание в виде ссылки, перечислены предпочтительные аминокислотные остатки ключевых участков канонических структур H1, встречающиеся в зародышевой линии человека, тогда как в табл. 4 на стр. 803, также специально включенной в виде ссылки, перечислены предпочтительные аминокислотные остатки в ключевых участках канонических структур CDR H2, встречающиеся в зародышевой линии человека. В одном варианте и H1, и H2 в домене VH антитела с высокой гомологией в сравнении с человеком имеют предполагаемую или фактическую каноническую структуру укладки, которая, по существу, идентична канонической структуре укладки, которая встречается в антителах человека. Антитела с высокой гомологией в сравнении с человеком могут содержать домен VH, в котором гипервариабельные петли H1 и H2 образуют сочетание канонических структур укладки, которое идентично сочетанию канонических структур, которое, как известно, встречается по меньшей мере в одном домене VH зародышевой линии человека. Было обнаружено, что только некоторые сочетания канонических структур укладки в H1 и H2 действительно встречаются в доменах VH, кодируемых в зародышевой линии человека. В одном варианте H1 и H2 в домене VH антитела с высокой гомологией в сравнении с человеком могут быть получены из домена VH вида, отличного от человека, например вида Camelidae, и все еще образовывать сочетание предполагаемых или фактических канонических структур укладки, которое идентично сочетанию канонических структур укладки, которое, как известно, встречается в домене VH зародышевой линии человека или в соматически мутантном домене VH. В неограничивающих вариантах H1 и H2 в домене VH антитела с высокой гомологией в сравнении с человеком могут быть получены из домена VH вида, отличного от человека, например вида Camelidae, и образовывать следующие сочетания канонической укладки: 1-1, 1-2, 1-3, 1-6, 1-4, 2-1, 3-1 и 3-5. Антитело с высокой гомологией в сравнении с человеком может содержать домен VH, который имеет высокую идентичность последовательностей/гомологию последовательностей с VH человека, и который содержит гипервариабельные петли, имеющие структурную гомологию с VH человека. Может быть предпочтительным, чтобы канонические укладки, имеющиеся в H1 и H2 в домене VH антитела с высокой гомологией в сравнении с человеком, и их сочетания были "соответствующими" последовательности VH зародышевой линии человека, которая представляет собой наиболее близко совпадающую последовательность с доменом VH антитела с высокой гомологией в сравнении с человеком с точки зрения общей идентичности первичных аминокислотных последовательностей. В качестве примера, если наиболее близкое совпадение последовательности находится в домене VH3 зародышевой линии человека, то может быть предпочтительным, чтобы H1 и H2 образовывали сочетание канонических укладок, которое также встречается в природе в домене VH3 человека. Это может быть особенно важным в случае антител с высокой гомологией в сравнении с человеком, которые получают из вида, отличного от человека, например, антител, содержащих домены VH и VL, которые получены из обычных антител верблюдовых, особенно антител, содержащих гуманизированные домены VH и VL верблюдовых. Таким образом, в одном варианте домен VH GARP-антитела с высокой гомологией в сравнении с человеком может иметь идентичность последовательности или гомологию последовательности 80% или больше, 85% или больше, 90% или больше, 95% или больше, 97% или больше или вплоть до 99% или даже 100% с доменом VH человека на протяжении каркасных областей FR1, FR2, FR3 и FR4, и кроме того, H1 и H2 в том же самом антителе получают из домена VH животного, отличного от человека (например, получают из вида

Camelidae), но при этом образуется сочетание предполагаемых или фактических канонических структур укладки, которое является таким же, как сочетание канонических укладок, которое, как известно, встречается в природе в таком же домене VH человека. В других вариантах каждый из L1 и L2 в домене VL антитела с высокой гомологией в сравнении с человеком получают из домена VL вида, отличного от человека (например, домена VL, полученного от верблюдовых), и каждый имеет предполагаемую или фактическую каноническую структуру укладки, которая, по существу, идентична канонической структуре укладки, которая встречается в антителах человека. Как и в случае домена VH, гипервариабельные петли доменов VL и VLambda- и VKappa-типов могут принимать ограниченное количество конформаций или канонических структур, определяемых отчасти длиной, а также наличием ключевых аминокислотных остатков в определенных канонических положениях. В представляющем интерес антителе, имеющим высокую гомологию в сравнении с человеком, петли L1, L2 и L3, полученные из домена VL вида, отличного от человека, например вида Camelidae, могут быть оценены как имеющие каноническую структуру укладки, "по существу, идентичную" канонической структуре укладки, которая, как известно, встречается в антителах человека, если, по меньшей мере, удовлетворяется первый и предпочтительно оба следующих критерия:

1) идентичная длина, определяемая по количеству остатков, с наиболее близко совпадающим классом канонической структуры у человека;

2) по меньшей мере 33% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 50% идентичность с ключевыми аминокислотными остатками, описанными для соответствующих классов канонической структуры L1 и L2 человека, либо из репертуара VLambda, либо из репертуара VKappa (следует обратить внимание, что в целях указанного выше анализа петли L1 и L2 обрабатывают по отдельности и каждую сравнивают с ее наиболее близко совпадающим классом канонической структуры у человека). Указанный выше анализ основан на прогнозировании канонической структуры петель L1, L2 и L3 в домене VL представляющего интерес антитела. Если фактическая структура петель L1, L2 и L3 известна, например, на основе рентгеновской кристаллографии, то петли L1, L2 или L3, полученные из представляющего интерес антитела, также можно оценить как имеющие каноническую структуру укладки, "по существу, идентичную" канонической структуре укладки, которая, как известно, встречается в антителах человека, если длина петли отличается от длины наиболее близко совпадающего класса канонической структуры у человека (обычно +1 или +2 аминокислоты), но фактическая структура петель Camelidae совпадает с канонической укладкой у человека. Ключевые аминокислотные остатки, имеющиеся в классах канонических структур у человека в первой и второй гипервариабельных петлях доменов VH человека (H1 и H2), описаны в публикации Chothia et al., J. Mol. Biol. 227: 799-817 (1992), содержание которой включено в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме. В частности, в табл. 3 на стр. 802 в публикации Chothia и соавт., которая специально включена в настоящее описание в виде ссылки, перечислены предпочтительные аминокислотные остатки ключевых участков канонических структур H1, встречающиеся в зародышевой линии человека, тогда как в табл. 4 на стр. 803, также специально включенной в виде ссылки, перечислены предпочтительные аминокислотные остатки в ключевых участках канонических структур CDR H2, встречающиеся в зародышевой линии человека. В одном варианте и H1, и H2 в домене VH антитела с высокой гомологией в сравнении с человеком имеют предполагаемую или фактическую каноническую структуру укладки, которая, по существу, идентична канонической структуре укладки, которая встречается в антителах человека. Ключевые аминокислотные остатки, найденные в классах канонических структур у человека для CDR доменов VLambda и VKappa человека, описаны в публикациях Morea et al. Methods, 20: 267-279 (2000) и Martin et al., J. Mol. Biol., 263: 800-815 (1996). Репертуар структур домена VKappa человека также описан в публикации Tomlinson et al. EMBO J. 14: 4628-4638 (1995), а репертуар структур домена VLambda описан в публикации Williams et al. J. Mol. Biol., 264:220-232 (1996). Содержание всех указанных документов включено в настоящее описание в виде ссылки. L1 и L2 в домене VL антитела с высокой гомологией в сравнении с человеком могут образовывать сочетание предполагаемых или фактических канонических структур укладки, которое идентично сочетанию канонических структур укладки, которое, как известно, встречается в домене VL зародышевой линии человека. В неограничивающих вариантах L1 и L2 в домене VLambda антитела с высокой гомологией в сравнении с человеком (например, антитела, содержащего домен VL, полученный от верблюдовых, или его гуманизированного варианта) могут образовывать одно из следующих сочетаний канонических укладок: 11-7, 13-7 (A,B,C), 14-7 (A,B), 12-11, 14-11 и 12-12 (которые определены в публикации Williams et al. J. Mol. Biol. 264: 220-32 (1996) и показаны на сайте
http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVL.h tml).

В неограничивающих вариантах L1 и L2 в домене Vkappa могут образовывать одно из следующих сочетаний канонических укладок: 2-1, 3-1, 4-1 и 6-1 (которые определены в публикации Tomlinson et al. EMBO J. 14: 4628-38 (1995) и показаны на сайте
http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVK.h tml).

В следующем варианте все три L1, L2 и L3 в домене VL антитела с высокой гомологией в сравнении с человеком могут иметь, по существу, структуру человека. Предпочтительно, чтобы домен VL антитела с высокой гомологией в сравнении с человеком имел высокую идентичность последовательно-

стей/гомологию последовательностей с VL человека, а также чтобы гипервариабельные петли в домене VL имели гомологию структуры с VL человека.

В одном варианте домен VL GARP-антитела с высокой гомологией в сравнении с человеком может иметь идентичность последовательности 80% или больше, 85% или больше, 90% или больше, 95% или больше, 97% или больше или вплоть до 99% или даже 100% с доменом VL человека на протяжении каркасных областей FR1, FR2, FR3 и FR4, и, кроме того, гипервариабельная петля L1 и гипервариабельная петля L2 могут образовывать сочетание предполагаемых или фактических канонических структур укладки, которое является таким же, как сочетание канонических укладок, которое, как известно, встречается в природе в таком же домене VL человека. Конечно, предполагается, что домены VH, имеющие высокую идентичность последовательностей/гомологию последовательностей с VH человека, а также структурную гомологию с гипервариабельными петлями VH человека, можно сочетать с доменами VL, имеющими высокую идентичность последовательностей/гомологию последовательностей с VL человека, а также структурную гомологию с гипервариабельными петлями VL человека, с получением антител с высокой гомологией в сравнении с человеком, содержащих пары VH/VL (например, пары VH/VL, полученные от верблюдовых) с максимальной гомологией последовательностей и структурной гомологией с парами VH/VL, кодируемыми у человека.

"Иммуноспецифичный", "специфичный для" или "специфично связывать". В используемом в настоящем описании смысле говорят, что антитело является "иммуноспецифичным", "специфичным для" или "специфично связывает" антиген, если оно взаимодействует на регистрируемом уровне с антигеном, предпочтительно с константой аффинности, Ka, больше или равной примерно 10^4 M^{-1} или больше или равной примерно 10^5 M^{-1}, больше или равной примерно 10^6 M^{-1}, больше или равной примерно 10^7 M^{-1}, или больше или равной 10^8 M^{-1}, или больше или равной 10^9 M^{-1}, или больше или равной 10^{10} M^{-1}. Аффинность антитела по отношению к родственному ему антигену также обычно выражают в виде константы диссоциации Kd, и в некоторых вариантах антитело специфично связывается с антигеном, если оно связывается с Kd меньше или равной 10^{-4} M, меньше или равной примерно 10^{-5} M, меньше или равной примерно 10^{-6} M, меньше или равной 10^{-7} M, или меньше или равной 10^{-8} M, или меньше или равной $5{\cdot}10^{-9}$ M, или меньше или равной 10^{-9} M, или меньше или равной $5{\cdot}10^{-10}$ M, или меньше или равной 10^{-10} M. Аффинности антител легко могут быть определены с использованием обычным способов, например способов, описанных в публикации Scatchard G. et al. (The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. NY Acad. Sci. 1949; 51: 660-672). Связывающие свойства антитела по отношению к антигенам, клеткам или тканям обычно можно определить и оценить, используя способы иммунодетекции, включая, например, основанные на иммунофлуоресценции анализы, такие как иммуногистохимия (IHC) и/или активируемая флуоресценцией сортировка клеток (FACS).

"Изолированная нуклеиновая кислота". В используемом в настоящем описании смысле термин означает нуклеиновую кислоту, которая, по существу, отделена от других геномных последовательностей ДНК, а также белков или комплексов, таких как рибосомы и полимеразы, которые в природе сопровождают нативную последовательность. Термин охватывает последовательность нуклеиновой кислоты, которая была извлечена из ее встречающегося в природе окружения, и включает изоляты рекомбинантной или клонированной ДНК и химически синтезированные аналоги или аналоги, биологически синтезированные в гетерологичных системах. По существу, чистая нуклеиновая кислота включает изолированные формы нуклеиновой кислоты. Конечно, термин относится к нуклеиновой кислоте, которая исходно изолирована и не содержит генов или последовательностей, добавленных позднее искусственно к изолированной нуклеиновой кислоте. Термин "полипептид" используют в его обычном значении, т.е. в виде последовательности аминокислот. Полипептиды не ограничены конкретной длиной продукта. Пептиды, олигопептиды и белки включены в определение полипептида, и такие термины могут быть использованы в настоящем описании взаимозаменяемо, если специально не указано иное. Такой термин также не относится или исключает модификации полипептида после экспрессии, например, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п., а также другие модификации, известные в данной области, как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе. Полипептид может представлять собой полный белок или его подпоследовательность. Конкретные представляющие интерес полипептиды в контексте настоящего изобретения представляют собой подпоследовательности аминокислот, содержащие CDR и способные связывать антиген. "Изолированный полипептид" представляет собой полипептид, который был идентифицирован и отделен и/или извлечен из компонентов его природного окружения. В предпочтительных вариантах изолированный полипептид может быть очищен (1) до более чем 95 мас.% полипептида согласно определению способом Лоури и наиболее предпочтительно более чем до 99 мас.%, (2) в степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности при использовании секвенатора с вращающимся стаканом; или (3) до гомогенности, которую выявляют в SDS-ПААГ в восстанавливающих или не восстанавливающих условиях и с использованием окрашивания Кумасси синим или предпочтительно серебром. Изолированный полипептид включает полипептид in situ в рекомбинантных клетках, так как по меньшей мере один компонент из природного окружения полипептида не будет присутствовать. Однако обычно изолированный полипептид может быть получен, по меньшей мере, в результате одной стадии очистки.

"Идентичность" или "идентичный". В используемом в настоящем описании смысле термин "идентичность" или "идентичный" при использовании в связи с последовательностями двух или более полипептидов относится к степени родства последовательностей между полипептидами, которое определяют по количеству совпадений между цепочками из двух или более аминокислотных остатков. "Идентичность" измеряет процент идентичных совпадений с меньшей из двух или более последовательностей с использованием выравниваний с пробелами (если имеются), осуществляемых с применением конкретной математической модели или компьютерной программы (т.е. "алгоритмов"). Идентичность родственных полипептидов может быть легко вычислена известными способами. Такие способы включают, но без ограничения, способы, описанные в Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; и Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988). Предпочтительные способы определения идентичности разработаны так, чтобы получить наибольшее совпадение между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности описаны в общедоступных компьютерных программах. Предпочтительные основанные на компьютерных программах способы определения идентичности между двумя последовательностями включают пакет программ GCG, включая GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. 2, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). Программа BLASTX общедоступна из National Center for Biotechnology Information (NCBI) и других источников (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., выше). Хорошо известный алгоритм Смита-Ватермана также можно использовать для определения идентичности.

"Модифицированное антитело". В используемом в настоящем описании смысле термин "модифицированное антитело" включает синтетические формы антител, которые изменены так, что они отличаются от встречающихся в природе, например антитела, которые содержат по меньшей мере две области тяжелой цепи, а не две полных тяжелых цепи (такие как антитела с делетированными доменами или миниантитела); полиспецифичные формы антител (например, биспецифичные, триспецифичные и т.д.), измененные для связывания с двумя или большим количеством разных антигенов или с разными эпитопами на одном антигене); молекулы тяжелых цепей, связанные с молекулами scFv и т.п. Молекулы scFv известны в данной области и описаны, например, в патенте США 5892019. Кроме того, термин "модифицированное антитело" включает поливалентные формы антител (например, тривалентные, тетравалентные и т.д., антитела, которые связываются с тремя или более копиями одного и того же антигена). В другом варианте модифицированное антитело согласно изобретению представляет собой слитый белок, содержащий по меньшей мере одну область тяжелой цепи, в которой отсутствует домен CH2, и содержащий связывающий домен полипептида, содержащий связывающую область одного представителя пары рецептор-лиганд.

"Млекопитающее". В используемом в настоящем описании смысле термин "млекопитающее" относится к любому млекопитающему, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных и животных в зоопарке, спортивных животных или домашних животных, таких как собаки, кошки, коровы, лошади, овцы, свиньи, козы, кролики и т.д. Предпочтительно млекопитающим является человек.

"Моноклональное антитело". В используемом в настоящем описании смысле термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции, по существу, гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в минорных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, будучи направленными против одного антигенного участка. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые содержат разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к специфичности моноклональные антитела имеют преимущество, которое состоит в том, что они могут быть синтезированы без примесей других антител. Определение "моноклональное" не следует рассматривать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, применяемые в настоящем изобретении, могут быть получены способом на основе гибридом, впервые описанным Kohler с соавт. (Nature, 256:495 (1975)), или могут быть получены способами на основе рекомбинантной ДНК в бактериальных, эукариотических животных или растительных клетках (см., например, патент США № 4816567). "Моноклональные антитела" также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с использованием способов, описанных, например, в публикациях Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991).

"Нативная последовательность". В используемом в настоящем описании смысле термин "нативная последовательность" относится к полинуклеотиду, который имеет такую же нуклеотидную последовательность, как и полинуклеотид, полученный из природы. Полипептид с "нативной последовательностью" представляет собой полипептид, который имеет такую же аминокислотную последовательность,

как и полипептид (например, антитело), полученный из природы (например, из любого вида). Такие полинуклеотиды и полипептиды с нативной последовательностью могут быть выделены из природного источника или могут быть получены способами, основанными на рекомбинации или синтезе. "Вариант" полинуклеотида в используемом в настоящем описании смысле данного термина означает полинуклеотид, который обычно отличается от полинуклеотида, специально описанного в настоящей публикации, одной или несколькими заменами, делециями, добавлениями и/или инсерциями. Такие варианты могут встречаться в природе или могут быть созданы синтетически, например, в результате модификации одной или нескольких полинуклеотидных последовательностей согласно изобретению и оценки одной или нескольких биологических активностей кодируемого полипептида, как описано в настоящей публикации, и/или с использованием любого из нескольких методик, хорошо известных в данной области. "Вариант" полипептида в используемом в настоящем описании смысле данного термина представляет собой полипептид, который обычно отличается от полипептида, специально раскрытого в настоящем описании, одной или несколькими заменами, делециями, добавлениями и/или инсерциями. Такие варианты могут встречаться в природе или могут быть созданы синтетически, например, в результате модификации одной или несколько полипептидных последовательностей согласно изобретению и оценки одной или нескольких биологических активностей полипептида. как описано в настоящей публикации, и/или с использованием любого из нескольких методик, хорошо известных в данной области. Можно осуществить модификации в структуре полинуклеотидов и полипептидов согласно настоящему изобретению и все еще получить функциональную молекулу, которая кодирует вариант или производное полипептида с требуемыми характеристиками. Когда требуется изменить аминокислотную последовательность полипептида для создания эквивалентного или даже улучшенного варианта или области полипептида согласно изобретению, специалист в данной области обычно может изменить один или несколько кодонов кодирующей последовательности ДНК. Например, некоторые аминокислоты могут быть заменены другими аминокислотами в структуре белка без заметной утраты его способности связывать другие полипептиды (например, антигены) или клетки. Так как способность к связыванию и природа белка определяют биологическую функциональную активность белка, могут быть осуществлены некоторые замены аминокислотной последовательности в последовательности белка, и конечно в кодирующей последовательности ДНК, лежащей в ее основе, и, тем не менее, получить белок с подобными свойствами. Таким образом, предполагается, что различные изменения могут быть осуществлены в пептидных последовательностях заявленных композиций или соответствующих последовательностях ДНК, которые кодируют указанные пептиды без существенной потери их биологической пользы или активности. Во многих случаях вариант полипептида будет содержать одну или несколько консервативных замен. "Консервативная замена" представляет собой замену, при которой аминокислоту заменяют другой аминокислотой, которая обладает сходными свойствами, так что специалист в области химии пептидов может ожидать, что вторичная структура и гидропатическая природа полипептида существенно не изменится. Как указано выше, аминокислотные замены обычно основаны на относительном сходстве заместителей боковых цепей аминокислот, например их гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера и т.п. Примеры замен, при которых учитывают несколько из указанных выше характеристик, хорошо известны специалистам в данной области и включают аргинин и лизин; глутамат и аспартат; серин и треонин; глутамин и аспарагин; валин, лейцин и изолейцин. Аминокислотные замены, кроме того, могут быть осуществлены на основе сходства полярности, заряда, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природы остатков. Например, отрицательно заряженные аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту; положительно заряженные аминокислоты включают лизин и аргинин; и аминокислоты с незаряженными полярными головками, имеющие сходные значения гидрофильности, включают лейцин, изолейцин и валин; глицин и аланин; аспарагин и глутамин; серин, треонин, фенилаланин и тирозин. Другие группы аминокислот, которые могут представлять консервативные изменения, включают (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; и (5) phe, tyr, trp, his. Вариант также может или альтернативно содержит неконсервативные изменения. В предпочтительном варианте варианты полипептидов отличаются от нативной последовательности заменой, делецией или добавлением пяти или меньше аминокислот. Варианты также (или альтернативно) могут быть модифицированы, например, посредством делеции или добавления аминокислот, которые оказывают минимальное влияние на иммуногенность, вторичную структуру и гидропатическую природу полипептида.

"Фармацевтически приемлемый эксципиент". В используемом в настоящем описании смысле термин "фармацевтически приемлемый эксципиент" включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, средства для изотоничности и замедления всасывания и т.п. Указанный эксципиент не вызывает нежелательной, аллергической или другой неблагоприятной реакции при введении животному, предпочтительно человеку. Для введения человеку препараты должны удовлетворять стандартам стерильности, пирогенности и общей безопасности и чистоты в соответствии с требованиями для стандартов управления по биопрепаратам FDA.

"Специфичность". В используемом в настоящем описании смысле термин "специфичность" относится к способности специфично связывать (например, иммунологически взаимодействовать) данную

мишень, например GARP. Полипептид может быть моноспецифичным и содержать один или несколько участков связывания, которые специфично связывают мишень, или полипептид может быть полиспецифичным и содержать два или более участков связывания, которые специфично связывают одну и ту же или разные мишени. В одном варианте антитело согласно изобретению специфично по отношению к более чем одной мишени. Например, в одном варианте полиспецифичная связывающая молекула согласно изобретению связывается с GARP и второй молекулой, экспрессируемой на опухолевой клетке. Примеры антител, которые содержат антигенсвязывающие участки, которые связываются с антигенами, экспрессируемыми на опухолевых клетках, известны в данной области, и одна или несколько CDR из таких антител могут быть включены в антитело согласно изобретению.

"Синтетический". В используемом в настоящем описании смысле термин "синтетический" по отношению к полипептидам включает полипептиды, которые содержат аминокислотную последовательность, которая не встречается в природе. Например, не встречающиеся в природе полипептиды представляют собой модифицированные формы встречающихся в природе полипептидов (например, содержащие мутацию, такую как добавление, замена или делеция) или полипептиды, которые содержат первую аминокислотную последовательность (которая может встречаться или не встречаться в природе), которая связана в виде линейной последовательности аминокислот со второй аминокислотной последовательностью (которая может встречаться или не встречаться в природе), с которой она не связана в природе.

"Одноцепочечный Fv", также сокращенно называемый "sFv" или "scFv". В используемом в настоящем описании смысле термины "одноцепочечный Fv", "sFv" или "scFv" означают фрагменты антител, которые содержат домены VH и VL антитела, связанные в одну полипептидную цепь. Предпочтительно полипептид sFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет sFv образовывать требуемую структуру для связывания антигена. Обзор sFv можно найти в публикации Pluckthun в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, ниже.

"Вариабельная область" или "вариабельный домен". В используемом в настоящем описании смысле термин "вариабельный" относится к тому факту, что некоторые области вариабельных доменов VH и VL сильно отличаются по последовательности в разных антителах и используются для связывания и специфичности каждого конкретного антитела по отношению к его антигену-мишени. Однако вариабельность неравномерно распределена по вариабельным доменам антител. Она сконцентрирована в трех участках, называемых "гипервариабельными петлями", в каждом домене VL и домене VH, которые образуют часть антигенсвязывающего участка. Первую, вторую и третью гипервариабельные петли домена легкой цепи VLambda в настоящем описании называют L1 (λ), L2 (λ) и L3 (λ), и они могут быть определены как содержащие остатки 24-33 (L1 (λ), состоящая из 9, 10 или 11 аминокислотных остатков), 49-53 (L2 (λ), состоящая из 3 остатков) и 90-96 (L3 (λ), состоящая из 6 остатков) в домене VL (Morea et al., Methods 20: 267-279 (2000)). Первую, вторую и третью гипервариабельные петли домена легкой цепи VKappa называют в настоящем описании L1 (κ), L2 (κ) и L3 (κ), и они могут быть определены как содержащие остатки 25-33 (L1 (κ), состоящая из 6, 7, 8, 11, 12 или 13 остатков), 49-53 (L2 (κ), состоящая из 3 остатков) и 90-97 (L3 (κ), состоящая из б остатков) в домене VL (Morea et al., Methods 20: 267-279 (2000)). Первую, вторую и третью гипервариабельные петли домена VH называют в настоящем описании H1, H2 и H3, и они могут быть определены как содержащие остатки 25-33 (H1, состоящая из 7, 8 или 9 остатков), 52-56 (H2, состоящая из 3 или 4 остатков) и 91-105 (H3, высоко вариабельная по длине) в домене VH (Morea et al., Methods 20: 267-279 (2000)). Если не указано иное, термины L1, L2 и L3, соответственно, относятся к первой, второй и третьей гипервариабельным петлям домена VL и охватывают гипервариабельные петли, полученные из изотипов Vkappa и Vlambda. Термины H1, H2 и H3, соответственно, относятся к первой, второй и третьей гипервариабельным петлям домена VH и охватывают гипервариабельные петли, полученные из любого из известных изотипов тяжелых цепей, включая γ, ε, δ или μ. Каждая из гипервариабельных петель L1, L2, L3, H1, H2 и H3 может содержать часть "определяющей комплементарность области" или "CDR", как определено ниже.

"Валентность". В используемом в настоящем описании смысле термин "валентность" относится к количеству потенциальных связывающих мишень участков в полипептиде. Каждый связывающий мишень участок специфично связывает одну молекулу-мишень или специфичный сайт на молекуле-мишени. Когда полипептид содержит более одного связывающего мишень участка, связывающие мишень участки могут специфично связывать одну и ту же или разные молекулы (например, могут связываться с разными лигандами или разными антигенами или разными эпитопами на одном и том же антигене). Рассматриваемые связывающие молекулы предпочтительно имеют по меньшей мере один связывающий участок, специфичный по отношению к молекуле GARP человека. В конкретных вариантах GARP-антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, могут быть, по меньшей мере, бивалентными.

"Процесс лечения", или "лечение", или "облегчение". В используемом в настоящем описании смысле термины "процесс лечения", или "лечение", или "облегчение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам; при этом цель заключается в предотвращении

или замедлении (уменьшении) целевого патологического состояния или расстройства. Нуждающимися в лечении являются те пациенты, которые уже имеют расстройство, а также те, которые предрасположены к возникновению расстройства, или те, у которых расстройство необходимо предотвратить. Пациента или млекопитающего успешно "лечат" по поводу инфекции, если после получения терапевтического количества антитела согласно способам, предлагаемым в настоящем изобретении, у пациента имеется наблюдаемое и/или измеряемое снижение или отсутствие одного или нескольких из следующих показателей: уменьшение количества патогенных клеток; снижение общего процента клеток, которые являются патогенными; и/или облегчение, в некоторой степени, одного или нескольких симптомов, ассоциированных с конкретным заболеванием или состоянием; снижение заболеваемости и смертности и улучшение качества жизни. Указанные выше параметры оценки успешного лечения и улучшения состояния при заболевании легко можно измерить обычными способами, известными лечащему врачу.

"TGF-β". В используемом в настоящем описании смысле термин TGF-β относится к трем изоформам, называемым TGF-β1, TGF-β2 и TGF-β3. Пептидные структуры изоформ TGF-β в высокой степени сходны (гомология порядка 70-80%). Все они кодируются в виде крупных белковых предшественников; TGF-β1 (GenBank, номер доступа: NM_000660) содержит 390 аминокислот, и каждый из TGF-β2 (GenBank, номера доступа: NM_001135599 и NM_003238) и TGF-β3 (GenBank, номер доступа: XM 005268028) содержит 412 аминокислот. Каждый из них имеет N-концевой сигнальный пептид из 20-30 аминокислот, который им необходим для секреции из клетки, прообласть (называемую ассоциированным с латентностью пептидом или LAP), и состоящую из 112-114 аминокислот C-концевую область, которая становится зрелой молекулой TGF-β после освобождения от прообласти в результате протеолитического расщепления.

Подробное описание

Одной из целей изобретения является белок, связывающийся с GARP в присутствии TGF-β.

Другой целью изобретения является белок, содержащий антигенсвязывающий домен, при этом антигенсвязывающий домен специфично связывается с GARP в присутствии TGF-β.

В одном варианте указанный белок связывается с GARP только в присутствии TGF-β.

GARP также называют содержащим богатые лейцином повторы 32 (LRRC32), и он относится к семейству с богатыми лейцином повторами. Полная аминокислотная последовательность белка GARP варианта транскрипта 2 согласно настоящему изобретению (SEQ ID NO: 1) (GenBank, номер доступа NM_001128922) представляет собой следующую последовательность:

MRPQILLLLALLTLGLAAQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTETLDLSG
NQLRSILASPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALTHLEHLSLAHNRLAMATALSAGGLG
PLPRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSNV
LMDIEDGAFEGLPRLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTW
LDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNAS
GRPLSQLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSHN
ALETLELGARALGSLRTLLLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPGPSGC
VAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFLHTPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQ
GNGLMVLQVDLPCFICLKRLNLAENRLSHLPAWTQAVSLEVLDLRNNSFSLLPGSAMGGLETS
LRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGLKN
INLIIILTFILVSAILLTTLAACCCVRRQKFNQQYKA.

В одном варианте белок согласно изобретению связывается с GARP в том случае, когда GARP находится в комплексе с TGF-β.

В другом варианте белок согласно изобретению связывается с GARP в том случае, когда GARP находится в комплексе с латентным TGF-β.

В другом варианте белок согласно изобретению связывается с комплексом GARP и TGF-β.

В одном варианте белок согласно изобретению связывается с комплексом GARP и TGF-β1; TGF-β2, изоформа 1; TGF-β2, изоформа 2; TGF-β3. Предпочтительно белок согласно изобретению связывается с комплексом GARP и TGF-β1.

В другом варианте белок согласно изобретению связывается с комплексом GARP и латентного TGF-β.

Термин "латентный TGF-β" в используемом в настоящем описании смысле включает комплекс, в котором C-концевой фрагмент или зрелый TGF-β1 остается нековалентно связанным с N-концевым фрагментом, известным как LAP.

В другом варианте белок согласно изобретению связывается с комплексом GARP и латентного TGF-β с KD (равновесной константой диссоциации между антителом и его антигеном) менее чем 10^{-10} M.

В одном варианте указанный белок представляет собой молекулу антитела, выбранную из группы, состоящей из целого антитела, гуманизированного антитела, одноцепочечного антитела, димерного од-

ноцепочечного антитела, Fv, Fab, $F(ab)'_2$, дефукозилированного антитела, биспецифичного антитела, диантитела, триантитела, тетраантитела.

В другом варианте указанный белок представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из униантитела, доменного антитела и наноантитела.

В другом варианте указанный белок представляет собой миметик антитела, выбранный из группы, состоящей из аффиантитела, аффилина, аффитина, аднектина, атримера, эвазина, DARPin, антикалина, авимера, финомера, версатела и дуокалина.

Доменное антитело хорошо известно в данной области и относится к наименьшим функциональным связывающим единицам антител, соответствующим вариабельным областям либо тяжелой, либо легкой цепей антител.

Наноантитело хорошо известно в данной области и относится к полученному из антитела терапевтическому белку, который обладает уникальными структурными и функциональными свойствами встречающихся в природе антител с тяжелыми цепями. Такие антитела с тяжелыми цепями содержат один вариабельный домен (VHH) и два константных домена (CH2 и CH3).

Униантитело хорошо известно в данной области и относится к фрагменту антитела, в котором отсутствует шарнирная область IgG4-антител. Делеция шарнирной области приводит к получению молекулы, которая, по существу, имеет половинный размер традиционных IgG4-антител и имеет одновалентную область связывания, а не бивалентную область связывания IgG4-антител.

Аффиантитело хорошо известно в данной области и относится к аффинным белкам, основанным на состоящем из 58 аминокислотных остатков белковом домене, полученном из одного из связывающих IgG-доменов стафилококкового белка A.

DARPin (сконструированные белки с повторами анкирина) хорошо известны в данной области и относятся к методике, основанной на миметике антитела DRP (сконструированные белки с повторами), разработанной для исследования способности полипептидов, не являющихся антителами, к связыванию.

Антикалины хорошо известны в данной области и относятся к другой методике имитации антител, при этом специфичность связывания обусловлена липокалинами. Антикалины также могут быть в форме двойных направляющих к мишени белков, называемых дуокалинами.

Авимеры хорошо известны в данной области и относятся к другой методике имитации антител.

Версатела хорошо известны в данной области и относятся к другой методике имитации антител. Они представляют собой небольшие белки 3-5 кД с >15% цистеинов, которые образуют каркас с высокой плотностью дисульфидов, заменяющий гидрофобную сердцевину, которые имеют типичные белки.

В другом варианте указанный белок является иммуноконъюгатом, содержащим антитело или его фрагмент, конъюгированный с терапевтическим средством.

В другом варианте указанный белок является конъюгатом, содержащим белок согласно изобретению, конъюгированный с визуализирующим средством. Указанный белок можно использовать в случае применений для визуализации.

Другой целью изобретения является белок, который связывается с GARP и ингибирует передачу сигнала TGF-β.

В одном варианте указанный белок связывается с GARP в том случае, когда GARP находится в комплексе с TGF-β.

В другом варианте указанный белок связывается с GARP в том случае, когда GARP находится в комплексе с латентным TGF-β.

В другом варианте указанный белок связывается с комплексом GARP и TGF-β.

В другом варианте указанный белок связывается с комплексом GARP и латентного TGF-β.

В одном варианте указанный белок представляет собой молекулу антитела, выбранную из группы, состоящей из целого антитела, гуманизированного антитела, одноцепочечного антитела, димерного одноцепочечного антитела, Fv, Fab, $F(ab)'_2$, дефукозилированного антитела, биспецифичного антитела, диантитела, триантитела, тетраантитела.

В другом варианте указанный белок представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из униантитела, доменного антитела и наноантитела.

В другом варианте указанный белок представляет собой миметик антитела, выбранный из группы, состоящей из аффиантитела, аффилина, аффитина, аднектина, атримера, эвазина, DARPin, антикалина, авимера, финомера, версатела и дуокалина.

В одном варианте указанный белок является анти-hGARP-антителом (антителом против GARP человека) или его антигенсвязывающим фрагментом, который ингибирует передачу сигнала TGF-β.

В одном варианте указанный белок предотвращает или ингибирует активный высвобождаемый TGF-β или ингибирует высвобождение зрелого TGF-β из Treg.

В другом варианте указанный белок ингибирует или предотвращает связывание зрелого TGF-β с рецепторами TGF-β.

В другом варианте указанный белок ингибирует активность TGF-β и/или активацию молекул из пути передачи сигнала рецептора TGF-β.

В используемом в настоящем описании смысле термин "ингибировать" означает, что белок способен блокировать, снижать, предотвращать или нейтрализовать передачу сигнала TGF-β или высвобождение зрелого TGF-β из Treg или связывание зрелого TGF-β с рецепторами TGF-β или активность TGF-β и/или активацию молекул из пути передачи сигнала рецептора TGF-β.

В одном варианте указанный белок представляет собой моноклональное антитело.

В другом варианте указанный белок представляет собой поликлональное антитело.

В одном варианте указанный белок связывается с конформационным эпитопом.

В одном варианте указанный конформационный эпитоп содержит одну или несколько аминокислот hGARP.

В другом варианте указанный конформационный эпитоп содержит эпитоп GARP, модифицированный в результате нахождения GARP в комплексе с латентным TGF-β. В другом варианте указанный конформационный эпитоп содержит аминокислоты hGARP и аминокислоты латентного TGF-β.

В другом варианте указанный конформационный эпитоп является смешанным конформационным эпитопом и содержит аминокислоты и из GARP, и из TGF-β.

В другом варианте указанный конформационный эпитоп является индуцируемым связыванием конформационным эпитопом и содержит аминокислоты только из GARP, но который принимает другую конформацию в присутствии TGF-β.

В одном варианте указанный эпитоп содержит один или несколько остатков из остатков с 101 по 141 аминокислотной последовательности hGARP (SEQ ID NO: 1).

Такие остатки с 101 по 141 указаны в SEQ ID NO: 12:

HLSLAHNRLAMATALSAGGLGPLPRVTSLDLSGNSLYSGLL

В другом варианте осуществления изобретения указанный эпитоп содержит остатки 137, 138 и 139: YSG аминокислотной последовательности hGARP (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления изобретения указанный эпитоп содержит остатки 137, 138 и 139: YSG of hGARP аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 1) и requires the presence of TGF-β.

В другом варианте осуществления изобретения указанный эпитоп содержит остатки 137, 138 и 139: YSG аминокислотной последовательности hGARP (SEQ ID NO: 1) и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 следующих друг за другом остатков с N-концевой и/или C-концевой стороны от остатков 137, 138 и 139: YSG последовательности SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления изобретения указанный эпитоп содержит остатки 137, 138 и 139: YSG аминокислотной последовательности hGARP (SEQ ID NO: 1) и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 следующих друг за другом остатков с N-концевой и/или C-концевой стороны остатков 137, 138 и 139: YSG последовательности SEQ ID NO: 1, и требует присутствия TGF-β.

В одном варианте осуществления изобретения белок согласно изобретению связывается с эпитопами предпочтительно в пределах области 101-141 hGARP и ингибирует освобождение латентного TGF-β от GARP.

Специалист в данной области может определить способность белка ингибировать передачу сигнала TGF-β посредством измерения, например активации молекул из пути передачи сигнала рецептора TGF-β. Одним из примеров такого теста обычно является измерение фосфорилирования SMAD2 (как показано в примере 2 настоящего изобретения).

Целью изобретения является антитело против GARP человека или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором вариабельная область тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну из следующих CDR:

VH-CDR1: GFSLTGYGIN (SEQ ID NO: 2) или GYGIN (SEQ ID NO: 52);

VH-CDR2: MIWSDGSTDYNSVLTS (SEQ ID NO: 3); и

VH-CDR3: DRNYYDYDGAMDY (SEQ ID NO: 4).

Другой целью изобретения является анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором вариабельная область легкой цепи содержит по меньшей мере одну из следующих CDR:

VL-CDR1: KASDHIKNWLA (SEQ ID NO: 5);

VL-CDR2: GATSLEA (SEQ ID NO: 6); и

VL-CDR3: QQYWSTPWT (SEQ ID NO: 7).

Другой целью изобретения является антитело против GARP человека или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором вариабельная область тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну из следующих CDR:

VH-CDR1: SYYID (SEQ ID NO: 13);

VH-CDR2: RIDPEDGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 14); и

VH-CDR3: NEWETVVVGDLMYEYEY (SEQ ID NO: 15).

Другой целью изобретения является анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

в котором вариабельная область легкой цепи содержит по меньшей мере одну из следующих CDR:

VL-CDR1: $QASQX_1IX_2SX_3LA$ (SEQ ID NO: 16),

где X_1 означает S или T, X_2 означает S или V, X_3 означает Y или F;

VL-CDR2: $X_1X_2SX_3X_4X_5T$ (SEQ ID NO: 17),

где X_1 означает G или R; X_2 означает A или T; X_3 означает R или I; X_4 означает L или P; X_5 означает Q или K; и

VL-CDR3: $QQYX_1SX_2PX_3T$,

где X_1 означает D, A, Y или V; X_2 означает A, L или V; X_3 означает V или P (SEQ ID NO: 18).

Другой целью изобретения является анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором вариабельная область тяжелой цепи содержит VH-CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 13, VH-CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 14 и VH-CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 15, и вариабельная область легкой цепи содержит по меньшей мере одну из VL-CDR1, которые указаны в SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 31; по меньшей мере одну из VL-CDR2, которые указаны в SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 32, и по меньшей мере одну из VL-CDR3, которые указаны в SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 33.

Другой целью изобретения является анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором вариабельная область легкой цепи содержит по меньшей мере одну из следующих CDR:

VL-CDR1: QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 19);

VL-CDR2: GASRLQT (SEQ ID NO: 20); и

VL-CDR3: QQYDSLPVT (SEQ ID NO: 21).

Другой целью изобретения является анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором вариабельная область легкой цепи содержит по меньшей мере одну из следующих CDR:

VL-CDR1: QASQSIVSYLA (SEQ ID NO: 22);

VL-CDR2: GASRLQT (SEQ ID NO: 23); и

VL-CDR3: QQYASAPVT (SEQ ID NO: 24).

Другой целью изобретения является анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором вариабельная область легкой цепи содержит по меньшей мере одну из следующих CDR:

VL-CDR1: QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 25);

VL-CDR2: GTSRLKT (SEQ ID NO: 26); и

VL-CDR3: QQYYSAPVT (SEQ ID NO: 27).

Другой целью изобретения является анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором вариабельная область легкой цепи содержит по меньшей мере одну из следующих CDR:

VL-CDR1: QASQTISSFLA (SEQ ID NO: 28);

VL-CDR2: RASIPQT (SEQ ID NO: 29); и

VL-CDR3: QQYVSAPPT (SEQ ID NO: 30).

Другой целью изобретения является анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором вариабельная область легкой цепи содержит по меньшей мере одну из следующих CDR:

VL-CDR1: QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 31);

VL-CDR2: GASRLKT (SEQ ID NO: 32); и

VL-CDR3: QQYASVPVT (SEQ ID NO: 33).

В одном варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать домен CH1, шарнирную область, домен CH2 и домен CH3 антитела человека, в частности IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В одном варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в своей тяжелой цепи следующие CDR: VH-CDR1 GFSLTGYGIN (SEQ ID NO: 2), VH-CDR2 MIWSDGSTDYNSVLTS (SEQ ID NO: 3) и VH-CDR3 DRNYYDYDGAMDY (SEQ ID NO: 4).

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в своей тяжелой цепи следующие CDR: VH-CDR1 GYGIN (SEQ ID NO: 52), VH-CDR2 MIWSDGSTDYNSVLTS (SEQ ID NO: 3) и VH-CDR3 DRNYYDYDGAMDY (SEQ ID NO: 4).

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в своей легкой цепи следующие CDR: VL-CDR1 KASDHIKNWLA (SEQ ID NO: 5), VL-CDR2 GATSLEA (SEQ ID NO: 6) и VL-CDR3 QQYWSTPWT (SEQ ID NO: 7).

В одном варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в своей тяжелой цепи следующие CDR: VH-CDR1 SYYID (SEQ ID NO: 13), VH-CDR2 RIDPEDGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 14) и VH-CDR3 NEWETVVVGDLMYEYEY (SEQ ID

NO: 15).

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в своей легкой цепи следующие CDR: VL-CDR1 QASQX_1IX_2SX_3LA (SEQ ID NO: 16), где X_1 означает S или T, X_2 означает S или V, X_3 означает Y или F; VL-CDR2 $X_1X_2SX_3X_4X_5$T (SEQ ID NO: 17), где X_1 означает G или R; X_2 означает A или T; X_3 означает R или I; X_4 означает L или P; X_5 означает Q или K; и VL-CDR3 QQYX_1SX_2PX_3T, где X_1 означает D, A, Y или V; X_2 означает A, L или V; X_3 означает V или P (SEQ ID NO: 18).

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в своей легкой цепи следующие CDR: VL-CDR1 QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 19), VL-CDR2 GASRLQT (SEQ ID NO: 20) и VL-CDR3 QQYDSLPVT (SEQ ID NO: 21).

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в своей легкой цепи следующие CDR: VL-CDR1 QASQSIVSYLA (SEQ ID NO: 22); VL-CDR2 GASRLQT (SEQ ID NO: 23) и VL-CDR3: QQYASAPVT (SEQ ID NO: 24).

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в своей легкой цепи следующие CDR: VL-CDR1 QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 25); VL-CDR2 GTSRLKT (SEQ ID NO: 26) и VL-CDR3 QQYYSAPVT (SEQ ID NO: 27).

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в своей легкой цепи следующие CDR: VL-CDR1 QASQTISSFLA (SEQ ID NO: 28); VL-CDR2 RASIPQT (SEQ ID NO: 29) и VL-CDR3 QQYVSAPPT (SEQ ID NO: 30).

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в своей легкой цепи следующие CDR: VL-CDR1 QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 31); VL-CDR2 GASRLKT (SEQ ID NO: 32) и VL-CDR3 QQYASVPVT (SEQ ID NO: 33).

Согласно изобретению любая из CDR 1, 2 и 3 тяжелой и легкой цепей может быть охарактеризована как имеющая аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% идентичность с конкретной CDR или группами CDR, указанными соответствующими номерами SEQ ID NO.

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из антитела, имеющего:

(i) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3), которые показаны в SEQ ID NO: 2, 3 и 4; и

(ii) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 легкой цепи (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3), которые показаны в SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно;

в которых необязательно одна, две, три или больше аминокислот в любой из указанных последовательностей могут быть заменены другой аминокислотой.

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из антитела, имеющего:

(i) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3), которые показаны в SEQ ID NO: 52, 3 и 4; и

(ii) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 легкой цепи (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3), которые показаны в ID NO: 5, 6 и 7 соответственно;

в которых необязательно одна, две, три или больше аминокислот в любой из указанных последовательностей могут быть заменены другой аминокислотой.

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из группы, состоящей из антитела, имеющего:

(i) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3), которые показаны в SEQ ID NO: 13, 14 и 15; и

(ii) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 легкой цепи (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3), которые показаны в SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно;

в которых необязательно одна, две, три или больше аминокислот в любой из указанных последовательностей могут быть заменены другой аминокислотой.

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3), которые показаны в SEQ ID NO: 13, 14 и 15; и

(i) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 легкой цепи (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3), которые показаны в SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно;

в которых необязательно одна, две, три или больше аминокислот в любой из указанных последовательностей могут быть заменены другой аминокислотой.

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3), которые показаны в SEQ ID NO: 13, 14 и 15; и

(ii) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 легкой цепи (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3), которые показаны в SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно;

в которых необязательно одна, две, три или больше аминокислот в любой из указанных последовательностей могут быть заменены другой аминокислотой.

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3), которые показаны в SEQ ID NO: 13, 14 и 15; и

(ii) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 легкой цепи (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3), которые показаны в SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно;

в которых необязательно одна, две, три или больше аминокислот в любой из указанных последовательностей могут быть заменены другой аминокислотой.

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3), которые показаны в SEQ ID NO: 13, 14 и 15; и

(ii) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 легкой цепи (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3), которые показаны в SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно;

в которых необязательно одна, две, три или больше аминокислот в любой из указанных последовательностей могут быть заменены другой аминокислотой.

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи (VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3), которые показаны в SEQ ID NO: 13, 14 и 15; и

(ii) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 легкой цепи (VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3), которые показаны в SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно;

в которых необязательно одна, две, три или больше аминокислот в любой из указанных последовательностей могут быть заменены другой аминокислотой.

В одном варианте анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (DRNYYDYDGAMDY) или вариант такой последовательности, при этом вариант последовательности содержит одну, две или три аминокислотных замены в указанной последовательности.

В одном варианте анти-hGARP-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или вариант такой последовательности, при этом вариант последовательности содержит одну, две или три аминокислотных замены в указанной последовательности.

Другой целью изобретения является анти-hGARP-антитело MHGARP8 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 8 и вариабельную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 9.

MAVLALLFCLVTFPSCILSQVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTGYGINWVRQ PPGKGLEWLGMIWSDGSTDYNSVLTSRLRISKDNSNSQVFLKMNSLQVDDTARYYCARDRNYY DYDGAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 8).

MKFPSQLLLFLLFRITGIICDIQVTQSSSYLSVSLGDRVTITCKASDHIKNWLAWYQQ KPGIAPRLLVSGATSLEAGVPSRFSGSGSGKNFTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGG TTLEIR (SEQ ID NO: 9).

Другой целью изобретения является анти-hGARP-антитело MHGARP8 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 50 и вариабельную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 51, при этом последовательности SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51 соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 соответственно, в которых удалены последовательности сигнальных пептидов.

QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTGYGINWVRQPPGKGLEWLGMIWSDGSTD YNSVLTSRLRISKDNSNSQVFLKMNSLQVDDTARYYCARDRNYYDYDGAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 50).

DIQVTQSSSYLSVSLGDRVTITCKASDHIKNWLAWYQQKPGIAPRLLVSGATSLEAGV PSRFSGSGSGKNFTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGTTLEIR (SEQ ID NO: 51).

Другой целью изобретения является анти-hGARP-антитело LHG10 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 34 и вариабельную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 35.

EVQLVQPGAELRNSGASVKVSCKASGYRFTSYYIDWVRQAPGQGLEWMGRIDPEDGGT KYAQKFQGRVTFTADTSTSTAYVELSSLRSEDTAVYYCARNEWETVVVGDLMYEYEYWGQGTQ VTVSS (SEQ ID NO: 34).

DIQMTQSPTSLSASLGDRVTITCQASQSISSYLAWYQQKPGQAPKLLIYGASRLQTGV PSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYYCQQYDSLPVTFGQGTKVELK (SEQ ID NO: 35).

Другой целью изобретения является анти-hGARP-антитело LHG10.3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 34 и вариабельную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 36.

DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCQASQSIVSYLAWYQQKPGQAPKLLIYGASRLQTGV PSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYYCQQYASAPVTFGQGTGVELK (SEQ ID NO: 36).

Другой целью изобретения является анти-hGARP-антитело LHG10.4 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 34 и вариабельную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 37.

DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCQASQSISSYLAWYQQKPGQAPKLLIYGTSRLKTGV PSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYYCQQYYSAPVTFGQGTKVELK (SEQ ID NO: 37).

Другой целью изобретения является анти-hGARP-антитело LHG10.5 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 34 и вариабельную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 38.

DIQMTQSPSSLSPSLGDRVTITCQASQTISSFLAWYHQKPGQPPKLLIYRASIPQTGV PSRFSGSGSGTSFTLTIGGLEAEDAGTYYCQQYVSAPPTFGQGTKVELK (SEQ ID NO: 38).

Другой целью изобретения является анти-hGARP-антитело LHG10.6 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 34 и вариабельную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 39.

DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCQASQSISSYLAWYQQKPGQAPNILIYGASRLKTGV PSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYYCQQYASVPVTFGQGTKVELK (SEQ ID NO: 39).

В одном варианте осуществления изобретения одна, две, три или больше аминокислот вариабельных областей тяжелой цепи или легкой цепи, которые описаны в настоящей публикации выше, могут быть заменены другой аминокислотой.

В другом варианте антитело согласно изобретению содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые являются гомологичными аминокислотным последовательностям антитела MHGARP8, описанного в настоящей публикации, и при этом антитела сохраняют требуемые функциональные свойства белка согласно изобретению.

В одном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области тяжелой цепи анти-hGARP согласно изобретению охватывает последовательности, которые имеют 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% идентичность с последовательностью SEQ ID NO: 8 или с последовательностью SEQ ID NO: 50.

В одном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи анти-hGARP согласно изобретению охватывает последовательности, которые имеют 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% идентичность с последовательностью SEQ ID NO: 9 или с последовательностью SEQ ID NO: 51.

В другом варианте антитело согласно изобретению содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые являются гомологичными аминокислотным последовательностям антитела LHG10, описанного в настоящей публикации, и при этом антитела сохраняют требуемые функциональные свойства белка согласно изобретению.

В одном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области тяжелой цепи анти-hGARP согласно изобретению охватывает последовательности, которые имеют 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% идентичность с последовательностью SEQ ID NO: 34.

В одном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи анти-hGARP согласно изобретению охватывает последовательности, которые имеют 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% идентичность с последовательностью SEQ ID NO: 35; 36; 37; 38 или 39.

В любом из антител согласно изобретению, например MHGARP8 или LHG10, специфичные последовательности вариабельной области и CDR могут содержать консервативные модификации последовательности. Консервативные модификации последовательности относятся к аминокислотным модификациям, которые значимо не влияют или не изменяют характеристики связывания антитела, содержащего

данную аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации могут быть введены в антитело согласно изобретению стандартными способами, известными в данной области, такими как сайт-специфичный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены обычно представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь со сходными физико-химическими свойствами. Специфичные последовательности вариабельной области и CDR могут содержать одну, две, три, четыре или больше инсерций, делеций или замен аминокислот. В том случае, когда осуществляют замены, предпочтительными заменами могут быть консервативные модификации. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области. Такие семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту) с незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), с β-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или несколько аминокислотных остатков в областях CDR антитела согласно изобретению могут быть заменены другими аминокислотными остатками из того же семейства аминокислот с боковыми цепями, и измененное антитело можно тестировать в отношении сохраняемой функции (т.е. в отношении свойств, указанных в настоящем описании), используя анализы, описанные в настоящей публикации, анти-hGARP-антитела также могут представлять собой CDR-привитые антитела, в которых CDR получены из антитела верблюдовых, например анти-hGARP-антитела верблюдовых, образованного после активной иммунизации с использованием hGARP.

В одном варианте изобретение относится к антителу, которое связывает, по существу, такой же эпитоп, что и антитело MHGARP8 или LHG10.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-hGARP-антитела, содержащие домены VH и VL или их CDR могут содержать домены CH1 и/или домены CL, аминокислотная последовательность которых является полностью или в значительной степени человеческой. В том случае, когда антигенсвязывающий полипептид согласно изобретению представляет собой антитело, предназначенное для терапевтического применения на человеке, обычно полная константная область антитела или по меньшей мере ее часть имеет полностью человеческую или в значительной степени человеческую аминокислотную последовательность. Таким образом, один или несколько доменов или любое сочетание домена CH1, шарнирной области, домена CH2, домена CH3 и домена CL (и домена CH4, если он присутствует) может быть полностью или в значительной степени человеческим в отношении аминокислотной последовательности. Преимущественно домен CH1, шарнирная область, домен CH2, домен CH3 и домен CL (и домен CH4, если присутствует) могут иметь полностью или в значительной степени человеческую аминокислотную последовательность. В контексте константной области гуманизированного или химерного антитела или фрагмента антитела термин "в значительной степени человеческий" относится к идентичности аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 99% с константной областью человека. Термин "человеческая аминокислотная последовательность" в данном контексте относится к аминокислотной последовательности, которая кодируется геном иммуноглобулина человека, который включает гены зародышевой линии, подвергнутые реаранжировке и соматическим мутациям гены. Изобретение также охватывает полипептиды, содержащие константные домены с "человеческой" последовательностью, которые были изменены в результате добавлений, делеций или замен одной или нескольких аминокислот в сравнении с человеческой последовательностью, за исключением таких вариантов, когда специально требуется присутствие "полностью человеческой" шарнирной области. Присутствие "полностью человеческой" шарнирной области в анти-hGARP-антителах согласно изобретению может быть полезным для минимизации иммуногенности и оптимизации стабильности антитела. Считается, что одна или несколько аминокислотных замен, инсерций или делеций могут быть осуществлены в константной области тяжелой и/или легкой цепи, в частности в Fc-области. Аминокислотные замены могут приводить к замене заменяемой аминокислоты другой встречающейся в природе аминокислотой или неприродной или модифицированной аминокислотой. Также осуществляют другие структурные модификации, такие как, например, изменения в картине гликозилирования (например, добавление или делеция сайтов N- или O-связанного гликозилирования). В зависимости от предполагаемого применения антитела может быть желательным модифицировать антитело согласно изобретению в отношении его свойств связывания с рецепторами Fc, например, чтобы модулировать эффекторную функцию. Например, может быть введен остаток(ки) цистеина в Fc-область, чтобы обеспечить таким образом образование дисульфидных связей в такой области. Гомодимерное антитело, созданное таким образом, может иметь улучшенную эффекторную функцию. См. публикации Caron et al., J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992) и Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). Альтернативно может быть сконструировано GARP-антитело, которое имеет двойные Fc-области, и поэтому могут обладать повышенными способностями к опосредованному комплементом лизису и ADCC.

См. публикации Stevenson et al., Anti-cancer Drug Design. 3: 219-230 (1989). Изобретение также относится к иммуноконъюгатам, содержащим антитело, которое описано в настоящей публикации, конъюгированное с цитотоксическим средством, таким как химиотерапевтическое средство, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат). Также могут быть сконструированы Fc-области для удлинения времени полужизни, как описано в публикации Chan и Carter (2010, Nature Reviews: Immunology, 10: 301-316), включенной в настоящее описание в виде ссылки. Варианты анти-hGARP-антител, в которых Fc-область модифицирована посредством конструирования белка, как описано в настоящей публикации, также могут иметь повышенную эффективность (например, в терапевтических/диагностических средствах) по сравнению с эквивалентным антителом (т.е. при эквивалентных антигенсвязывающих свойствах) без модификации Fc. В другом варианте Fc-область модифицируют для повышения способности антитела опосредовать зависимую от антител клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или чтобы повысить аффинность антитела по отношению к рецептору Fcγ, чтобы модифицировать одну или несколько аминокислот. В еще одном варианте модифицируют гликозилирование антитела. Например, может быть получено агликозилированное антитело (т.е. антитело в котором отсутствует гликозилирование). Гликозилирование может быть изменено, например, чтобы повысить аффинность антитела по отношению к антигену-мишени GARP. Такие углеводные модификации могут быть осуществлены, например, за счет изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, могут быть осуществлены одна или несколько аминокислотных замен, которые приводят к исключению одного или нескольких сайтов гликозилирования каркаса вариабельной области с целью исключения, таким образом, гликозилирования в данном сайте. Такое агликозилирование может повышать аффинность антитела по отношению к антигену. Также предусмотрены варианты анти-hGARP-антител, имеющие измененный тип гликозилирования, такие как гипофукозилированное антитело, имеющее уменьшенные количества остатков фукозила, или нефукозилированное антитело (которое описано в Natsume et al., 2009 Drug Design Development and Therapy, 3:7-16) или антитело, имеющее увеличенные ветвящиеся структуры GlcNac. Было показано, что такие измененные картины гликозилирования повышают ADCC-активность антител, приводят обычно к 10-кратному усилению ADCC по сравнению с эквивалентным антителом, содержащим "нативный" Fc-домен человека. Такие углеводные модификации могут быть осуществлены, например, в результате экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным ферментативным аппаратом гликозилирования (как описано в Yamane-Ohnuki and Satoh, 2009 mAbs 1(3): 230-236).

В одном варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело содержит Fc-область, имеющую последовательность SEQ ID NO: 47.

PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 47).

В другом варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело содержит область константного домена тяжелой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 48, где X означает N или подвергнут мутации в Q, чтобы ингибировать ADCC.

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYXSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 48).

В одном варианте осуществления изобретения остаток 297 в последовательности SEQ ID NO: 48 агликозилирован.

В другом варианте осуществления изобретения остаток N в положении 297 последовательности SEQ ID NO: 48 мутирован в Q.

В одном варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело содержит область константного домена легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 49.

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 49).

В следующих вариантах осуществления изобретения анти-hGARP-антитела могут не иметь эффек-

торной функции, либо вследствие того, что Fc-область антитела относится к изотипу, который не имеет в природе эффекторной функции или который имеет значимо менее сильную эффекторную функцию, чем IgG1 человека, например IgG2 человека или IgG4 человека, либо вследствие того, что Fc-область антитела была сконструирована так, чтобы снизить или, по существу, исключить эффекторную функцию, как описано в Armour K.L., et al., Eur. J. Immunol., 1999, 29: 2613-2624.

В следующих вариантах Fc-область анти-hGMP-антитела может быть сконструирована так, чтобы облегчить предпочтительное образование биспецифичных антител, в которых две тяжелых цепи антитела, содержащие разные вариабельные домены, спарены с образованием Fc-области биспецифичного антитела. Примеры таких модификаций включают модификации "выступ во впадину", описанные в Ridgway J.B., Presta L.G., Carter P., 1996 Protein Eng. Jul; 9(7): 617-21 и Merchant A.M., et al., 1998 Nat. Biotechnol. Jul; 16 (7): 677-81.

В одном варианте осуществления изобретения анти-hGARP-антитело согласно изобретению может иметь одну или несколько эффекторных функций, выбранных из зависимой от антител опосредованной клетками цитотоксичности (ADCC), зависимой от комплемента цитотоксичности (CDC) и зависимого от антител опосредованного клетками фагоцитоза (ADCP) против клеток, экспрессирующих белок GARP человека на поверхности клеток. Антитело может проявлять ADCC против клеток со связанной с GARP дисфункцией. Антитело может иметь повышенную функцию ADCC по сравнению с эталонным антителом, которое эквивалентно антителу, содержащему нативный Fc-домен человека. В неограничивающем варианте функция ADCC может быть повышена по меньшей мере в 10 раз по сравнению с эталонным антителом, содержащим нативный Fc-домен человека. В данном контексте термин "эквивалентно" может быть использован для обозначения того, что антитело с повышенной функцией ADCC проявляет, по существу, идентичную специфичность связывания антигена и/или имеет идентичную аминокислотную последовательность, что и эталонное антитело, за исключением любых сделанных модификаций (относительно нативного Fc человека) в целях усиления ADCC. Антитело может содержать шарнирную область, домен CH1, домен CH2 и домен CH3 IgG человека, наиболее предпочтительно IgG1 человека. Такое антитело может включать модификации в Fc-области, такие как, например, замены, делеции или инсерции или другие структурные модификации для усиления или уменьшения Fc-зависимых функций.

Одна из целей настоящего изобретения относится к анти-hGARP-антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые ингибируют передачу сигнала TGF-β, и которые могут быть особенно полезны для терапевтических применений, при которых полезна эффекторная функция антитела, т.е. ADCC, CDC, ADCP, и в частности, усиленная эффекторная функция. Следовательно, GARP-антитела, описанные в настоящей публикации, которые проявляют эффекторную функцию (или усиленную эффекторную функцию) и которые ингибируют TGF-β, могут быть особенно предпочтительными при некоторых терапевтических применениях, например при лечении злокачественной опухоли, хронической инфекции, фиброза, когда полезна эффекторная функция антитела.

Другой целью изобретения является изолированная полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 50. Предпочтительно указанная нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность SEQ ID NO: 10:

ATGGCTGTCCTGGCATTACTCTTCTGCCTGGTAACATTCCCAAGCTGTATCCTTTCCC
AGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACAT
GCACCGTCTCAGGGTTCTCATTAACCGGCTATGGTATAAACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAA
AGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGAGTGATGGAAGCACAGACTATAATTCAGTTCTCA
CATCCAGACTGAGGATCAGTAAGGATAATTCCAATAGCCAGGTTTTCTTAAAAATGAACAGTC
TGCAAGTTGATGACACAGCCAGGTACTATTGTGCCAGAGATCGAAACTACTATGATTACGACG
GGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA.

Другой целью изобретения является изолированная полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 51. Предпочтительно указанная нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность SEQ ID NO: 11:

ATGAAGTTTCCTTCTCAACTTCTGCTCTTCCTGCTGTTCAGAATCACAGGCATAATAT
GTGACATCCAGGTGACACAATCTTCATCCTACTTGTCTGTATCTCTAGGAGACAGGGTCACCA
TTACTTGCAAGGCAAGTGACCACATTAAAAATTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGAA
TTGCTCCTAGGCTCTTAGTTTCTGGTGCAACCAGTTTGGAAGCTGGGGTTCCTTCAAGATTCA
GTGGCAGTGGATCTGGAAAGAATTTCACTCTCAGCATTACCAGTCTTCAGACTGAAGATGTTG
CTACTTATTACTGTCAACAGTATTGGAGTACACCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCACTCTGG
AGATCAGA.

Другой целью изобретения является экспрессирующий вектор, содержащий нуклеотидные после-

довательности, кодирующие анти-hGARP-антитело согласно изобретению. В одном варианте экспрессирующий вектор согласно изобретению содержит по меньшей мере одну из последовательностей SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11 или любую последовательность, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% идентичность с указанными последовательностями SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11.

Другой целью изобретения является изолированная клетка-хозяин, содержащая указанный вектор. Указанная клетка-хозяин может быть применена для рекомбинантной продукции антител согласно изобретению. В одном варианте клетки-хозяева могут быть прокариотическими, дрожжевыми или эукариотическими клетками, предпочтительно клетками млекопитающих, такими как, например, линии клеток почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия клеток эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59 (1977)); клетки почки сирийского хомячка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); клетки шеломы мышей SP2/0-AG14 (ATCC CRL 1581; ATCC CRL 8287) или NSO (коллекции культур HPA, № 85110503); клетки почки обезьян (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки зеленой африканской мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крыс buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; и линия гепатомы человека (Hep G2), а также линии клеток DSM PERC-6. Экспрессирующие векторы, подходящие для применения в каждой из таких клеток-хозяев, также общеизвестны в данной области. Следует отметить, что термин "клетка-хозяин", в общем, относится к линии культивируемых клеток. Целый организм человека, в который был введен экспрессирующий вектор, кодирующий антигенсвязывающий полипептид согласно изобретению, однозначно исключен из определения "клетка-хозяин".

Другой целью изобретения является способ получения анти-hGARP-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который включает в себя культивирование клеток-хозяев, содержащих изолированную полинуклеотидную последовательность, кодирующую анти-hGARP-антитело, в условиях, подходящих для экспрессии анти-hGARP-антитела, и извлечение экспрессированного анти-hGARP-антитела. Такой основанный на рекомбинации способ можно применять для крупномасштабного получения GARP-антител согласно изобретению, включая моноклональные антитела, предназначенные для терапевтических, диагностических применений in vitro, ex vivo, in vivo. Такие способы доступны в данной области и будут известны специалисту.

Другой целью изобретения является линия клеток гибридомы, которая продуцирует указанное антитело согласно изобретению.

Предпочтительные линии клеток гибридомы согласно изобретению были депонированы с коллекции плазмид BCCM/LMBP, Department of Biomedical Molecular Biology, Ghent University, "Fiers-Schell-Van Montagu" building, Technologiepark 927, B-9052 Gent-Zwijnaarde BELGIUM (табл. 2).

Таблица 2

Линия клеток	№ депозита	Дата депонирования
Гибридома MHGARP8	LMBP 10246CB	30 мая 2013

Фрагменты и производные антител согласно настоящему изобретению (которые подпадают под термины "антитело" или "антитела", которые использованы в настоящей заявке, если не указано иное или явно не противоречит контексту), предпочтительно MHGARP8-подобное антитело, могут быть получены способами, которые известны в данной области. "Фрагменты" содержат область интактного антитела, обычно антигенсвязывающий участок или вариабельную область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$ и Fv; диантитела; любой фрагмент антитела, который представляет собой полипептид, имеющий первичную структуру, состоящую из одной непрерывной последовательности следующих друг за другом аминокислотных остатков (называемый в настоящем описании "одноцепочечным фрагментом антитела" или "одноцепочечным полипептидом"), включая без ограничения (1) молекулы одноцепочечного Fv, (2) одноцепочечные полипептиды, содержащие только один вариабельный домен легкой цепи или его фрагмент, который содержит три CDR вариабельного домена легкой цепи без ассоциированного остатка тяжелой цепи, и (3) одноцепочечные полипептиды, содержащие только одну вариабельную область тяжелой цепи или ее фрагмент, содержащий три CDR вариабельной области тяжелой цепи без ассоциированного остатка легкой цепи; и полиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты антител согласно настоящему изобретению могут быть получены с использованием стандартных способов. Например, фрагменты Fab или $F(ab')_2$ могут быть получены в результате расщепления протеазой изолированных антител согласно обычным

способам. Будет понятно, что иммунореактивные фрагменты могут быть модифицированы с использованием известных способов, например, чтобы замедлить клиренс in vivo и получить более необходимый фармакокинетический профиль, фрагмент может быть модифицирован полиэтиленгликолем (ПЭГ). Способы связывания и сайт-специфичного конъюгирования ПЭГ с фрагментом Fab' описаны, например, в Leong et al., Cytokines 16 (3): 106-119 (2001) и Delgado et al., Br. J. Cancer 73 (2): 175- 182 (1996), содержание которых включено в настоящее описание в виде ссылки. Альтернативно ДНК гибридомы, продуцирующей антитело согласно изобретению, предпочтительно MHGARP8-подобное или LHG10-подобное антитело, может быть модифицировано так, чтобы оно кодировало фрагмент согласно изобретению. Затем модифицированную ДНК встраивают в экспрессирующий вектор и используют для трансформации или трансфекции подходящей клетки, которая затем экспрессирует требуемый фрагмент.

В некоторых вариантах ДНК гибридомы, продуцирующей антитело согласно настоящему изобретению, предпочтительно MHGARP8-подобное или LHG10-подобное антитело, может быть модифицирована перед встраиванием в экспрессирующий вектор, например заменой кодирующей последовательностью константных доменов тяжелой и легкой цепей человека, вводимой вместо гомологичных последовательностей животного, отличного от человека (например, Morrison et al., PNAS pp. 6851 (1984)), или посредством ковалентного связывания с кодирующей иммуноглобулин последовательностью всей или части последовательности, кодирующей неиммуноглобулиновый полипептид. Таким образом, получают "химерные" или "гибридные" антитела, которые обладают специфичностью связывания исходного антитела. Обычно неиммуноглобулиновыми полипептидами заменяют константные домены антитела согласно изобретению.

Таким образом, согласно другому варианту антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, предпочтительно MHGARP8-или LHG10-подобное антитело является гуманизированным. "Гуманизированные" форму антител согласно настоящему изобретению представляют собой специфичные химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из мышиного иммуноглобулина. В большинстве случаев гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из определяющей комплементарность области (CDR) реципиента заменены остатками из CDR исходного антитела (донорного антитела) с сохранением при этом требуемой специфичности, аффинности и емкостью исходного антитела.

В некоторых случаях остатки Fv каркаса (FR) иммуноглобулина человека могут быть заменены соответствующими остатками животного, отличного от человека. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не встречаются ни в реципиентном антителе, ни в импортируемых последовательностях CDR или каркаса. Такие модификации осуществляют для того, чтобы дополнительно улучшить и оптимизировать эффективность антитела. В общем, гуманизированное антитело будет содержать, по существу, все из по меньшей мере одного и обычно двух вариабельных доменов, в которых все или, по существу, все области CDR соответствуют областям CDR исходного антитела, и все или, по существу, все области FR представляют собой области FR консенсусных последовательностей иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело оптимально также будет содержать, по меньшей мере, область константной области иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Дополнительные подробности см. в публикациях Jones et al., Nature, 321, pp. 522 (1986); Reichmann et al., Nature, 332, pp. 323 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 3, pp. 394 (1992); Verhoeyen et al., Science, 239, pp. 1534; и в патенте США № 4816567, полное содержание который включено в настоящее описание в виде ссылки. Способы гуманизации антител согласно настоящему изобретению хорошо известно в данной области.

Выбор вариабельных доменов человека как легкой, так и тяжелой цепи, используемых для получения гуманизированных антител, очень важен для уменьшения антигенности. Согласно так называемому способу "наилучшей подгонки" последовательность вариабельного домена антитела согласно настоящему изобретению подвергают скринингу против полной библиотеки известных последовательностей вариабельных доменов человека.

Последовательность человека, которая близка к последовательности мыши, затем принимают в качестве каркаса человека (FR) для гуманизированного антитела (Sims et al., J. Immunol. 151, pp. 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, pp. 901). В других способах используют определенный каркас из консенсусной последовательности всех антител человека конкретной подгруппы легкой или тяжелой цепей. Один и тот же каркас можно использовать для нескольких разных гуманизированных антител (Carter et al., PNAS 89, pp. 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151 (1993)). Кроме того, важно, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением высокой аффинности по отношению к GARP и других полезных биологических свойств. Для достижения указанной цели согласно предпочтительному способу гуманизированные антитела получают, осуществляя анализ исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов общедоступны и известны специалистам в данной области. Доступны компьютерные программы, которые и иллюстрируют и пред-

ставляют возможные трехмерные структуры выбранных в качестве кандидатов последовательностей иммуноглобулинов. Просмотр таких представлений позволяет проводить анализ вероятной роли остатков в функционировании выбранной в качестве кандидата последовательности иммуноглобулина, т.е. анализ остатков, которые влияют на способность выбранного в качестве кандидата иммуноглобулина связывать его антиген. Таким образом, могут быть отобраны и объединены остатки FR из консенсусной и импортируемой последовательностей так, чтобы добиться требуемой характеристики антитела, такой как повышенная аффинность по отношению к антигену(ам)-мишени(ям). В общем, остатки CDR непосредственно и наиболее значимо влияют на связывание антигена. Другой способ получения "гуманизированных" моноклональных антител заключается в применении ксеномыши (XenoMouse) (Abgenix, Fremont, CA) в качестве мыши, используемой для иммунизации. Ксеномышь представляет собой мышь-хозяин согласно настоящему изобретению, у которой гены иммуноглобулинов были заменены функциональными генами иммуноглобулинов человека. Таким образом, антитела, продуцируемые у такой мыши или в гибридомах, полученных из В-клеток такой мыши, уже гуманизированы. Ксеномышь описана в патенте США № 6162963, который включен в настоящее описание в виде ссылки в полном объеме.

Антитела человека также могут быть получены согласно различным другим способам, таким как способы с использованием иммунизации других трансгенных животных, которые были сконструированы для экспрессии репертуара антител человека (Jakobovitz et al. Nature 362 (1993) 255), или на основе отбора репертуара антител с использованием способов фагового дисплея. Такие способы известны специалисту и могут быть осуществлены, начиная с моноклональных антител, как описано в настоящей заявке.

В одном варианте гипервариабельные петли (или CDR) верблюдовых могут быть получены в результате активной иммунизации вида из семейства верблюдовых требуемым антигеном-мишенью. Как обсуждается и как подробно описано на примерах в настоящей публикации, после иммунизации Camelidae (либо нативного животного, либо трансгенного животного, сконструированного для экспрессии репертуара иммуноглобулинов вида верблюдовых) антигеном-мишенью могут быть идентифицированы В-клетки, продуцирующие (обычные Camelidae) антитела, обладающие специфичностью по отношению к требуемому антигену, и полинуклеотид, кодирующий домены VH и VL таких антител, могут быть выделены с использованием известных методик.

В одном варианте изобретение относится к рекомбинантному антигенсвязывающему полипептиду, иммунореактивному по отношению к антигену-мишени, полипептиду, содержащему домен VH и домен VL, при этом по меньшей мере одну гипервариабельную петлю или определяющую комплементарность область в домене VH или домене VL получают из домена VH или VL вида из семейства Camelidae, и такой антигенсвязывающий полипептид может быть получен способом, включающим в себя стадии:

(a) иммунизация вида из семейства Camelidae антигеном-мишенью или полинуклеотидом, кодирующим указанный антиген-мишень, и выработка антитела к указанному антигену-мишени;

(b) определение нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере одну гипервариабельную петлю или определяющую комплементарность область (CDR) домена VH и/или домена VL обычного антитела Camelidae, иммунореактивного по отношению к указанному антигену-мишени; и

(c) экспрессия антигенсвязывающего полипептида, иммунореактивного по отношению к указанному антигену-мишени,

при этом указанный антигенсвязывающий полипептид содержит домен VH и домен VL, и при этом по меньшей мере одна гипервариабельная петля или определяющая комплементарность область (CDR) домена VH или домена VL имеет аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью, определенной в п. (a).

Изолированные домены VH и VL Camelidae, полученные в результате активной иммунизации, могут быть использованы в качестве основы для конструирования антигенсвязывающих полипептидов согласно изобретению. Начиная с интактных доменов VH и VL Camelidae, можно сконструировать одну или несколько аминокислотных замен, инсерций или делеций, которые отличаются от исходной последовательности Camelidae.

В одном варианте такие замены, инсерции или делеции могут присутствовать в каркасных областях домена VH и/или домена VL. Целью таких изменений первичной аминокислотной последовательности может быть снижение предположительно неблагоприятных свойств (например, иммуногенности у человека-хозяина (так называемая гуманизация), участков потенциальной гетерогенности продукта и/или нестабильности (гликозилирование, дезамидирование, изомеризация и т.д.) или усиление некоторых других предпочтительных свойств молекулы (например, растворимости, стабильности, биодоступности и т.д.).

В другом варианте могут быть сконструированы изменения в первичной аминокислотной последовательности в одной или нескольких гипервариабельных петлях (или CDR) домена VH и/или VL Camelidae, полученных при активной иммунизации. Такие изменения могут быть введены для того, чтобы повысить аффинность и/или специфичность связывания антигена или чтобы уменьшить предположительно неблагоприятные свойства, например иммуногенность у человека-хозяина (так называемая гуманизация), участки потенциальной гетерогенности и/или нестабильность продукта, гликозилирование, дезамидирование, изомеризацию и т.д., или чтобы усилить некоторые другие предпочтительные свойства молекулы,

например растворимость, стабильность, биодоступность и т.д.

Антитела согласно настоящему изобретению, предпочтительно MHGARP8 или LHG10-подобное антитело, также могут быть дериватизованы с получением "химерных" антител (иммуноглобулинов), в которых область тяжелой/легкой цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в исходном антителе, тогда как остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого вида или относящихся к другому классу или подклассу антител, а также фрагментах таких антител, при условии, что они проявляют требуемую биологическую активность и специфичность связывания (Cabilly et al., выше; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., pp. 6851 (1984)).

Целью изобретения является композиция, содержащая по меньшей мере один из белков согласно изобретению, который описан в настоящей публикации выше.

Другой целью изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один из белков согласно изобретению, который описан в настоящей публикации выше, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Фармацевтически приемлемые эксципиенты, которые можно использовать в таких композиция включают без ограничения ионообменные вещества, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, собрат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как сульфат протамина, двузамещенный фосфат натрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы (например, натрийкарбоксиметилцеллюлоза), полиэтиленгликоль, полиакрилаты, воски, блок-полимеры полиэтилен-полиоксипропилен, полиэтиленгликоль и ланолин.

Другой целью изобретения является белок согласно изобретению для ингибирования активности TGF-β у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании.

Другой целью изобретения является способ ингибирования активности TGF-β у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании, включающий в себя введение субъекту эффективного количества белка согласно изобретению.

Другой целью изобретения является белок согласно изобретению или фармацевтическая композиция, которые определены в настоящем описании выше, для лечения связанного с TGF-β расстройства у субъекта, нуждающегося в таком лечении.

Другой целью изобретения является способ лечения связанного с TGF-β расстройства у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий в себя введение субъекту эффективного количества белка согласно изобретению.

Заболевания или расстройства, при которых можно применять способы согласно изобретению, включают все заболевания, при которых ингибирование TGF-β может быть полезным.

Указанное связанное с TGF-β расстройство включает без ограничения воспалительные заболевания, хроническую инфекцию, злокачественную опухоль, фиброз, сердечно-сосудистые заболевания, заболевания сосудов мозга (например, ишемический инсульт) и нейродегенеративные заболевания.

Для применения с целью введения субъекту композиция может быть приготовлена в виде препарата для введения субъекту. Композиции согласно настоящему изобретению можно вводить перорально, парентерально, в виде ингаляционного спрея, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или через имплантируемую емкость. Термин "введение", используемый в настоящем описании, включает способы подкожной, внутривенной, внутримышечной, внутрисуставной, интрасиновиальной, внутригрудинной, интратекальной, внутрипеченочной, внутриочаговой и интракраниальной инъекции или инфузии.

Стерильные инъекционные формы композиций согласно настоящему изобретению могут представлять собой водную или масляную суспензию. Такие суспензии могут быть приготовлены способами, известными в данной области, с использованием подходящих диспергирующих средств или увлажнителей и суспендирующих средств. Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе. К приемлемым наполнителям и растворителям, которые можно применять, относятся вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, обычно в качестве растворителя или суспензионной среды используют стерильные нелетучие масла. С указанной целью можно использовать любое безвкусное нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные, применимы для получения инъекционных средств, так как они являются природными фармацевтически приемлемыми маслами, такие как оливковое масло или касторовое масло, особенно в их полиоксиэтилированных формах. Такие масляные растворы или суспензии также могут содержать длинноцепочечный спиртовой разбавитель или диспергирующее средство, такое как карбоксиметилцеллюлоза или сходные диспергирующие средства, которые обычно используют при приготовлении фармацевтически приемлемых дозированных

форм, включая эмульсии и суспензии. Другие широко используемые поверхностно-активные вещества, такие как твины, спаны и другие эмульгаторы, или усилители биодоступности, которые обычно используют в производстве фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других дозированных форм, также можно применять в целях приготовления препарата.

Схемы и дозы для введения антитела в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению можно определить известными для таких продуктов способами, например, используя инструкции производителя. Например, антитело, присутствующее в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, может поставляться в концентрации 10 мг/мл во флаконах для одноразового применения на 100 мг (10 мл) или 500 мг (50 мл). Продукт готовят для внутривенного (в/в) введения в растворе, содержащем 9,0 мг/мл хлорида натрия, 7,35 мг/мл дигидрата цитрата натрия, 0,7 мг/мл полисорбата 80 и стерильную воду для инъекций. Значение pH доводят до 6,5. Будет понятно, что такие схемы являются примерными, и что оптимальная схема и schedule и режим могут быть адаптированы с учетом аффинности и переносимости конкретного антитела в фармацевтической композиции, которые необходимо определять в клинических испытаниях.

Другой целью изобретения является способ снижения иммуносупрессии в окружении опухоли у субъекта, нуждающегося в таком снижении, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества белка согласно изобретению.

Другой целью изобретения является способ стимуляции иммунной системы у субъекта, нуждающегося в такой стимуляции, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества белка согласно изобретению.

Другой целью изобретения является способ ингибирования иммуносупрессорной функции Treg человека у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества белка согласно изобретению.

Другой целью изобретения является способ лечения злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества белка согласно изобретению.

Другой целью изобретения является способ лечения злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в таком лечении, при этом фармацевтическую композицию согласно изобретению необходимо вводить в качестве иммуностимулирующего антитела для лечения пациентов со злокачественной опухолью.

Другой целью изобретения является способ лечения злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества белка согласно изобретению в сочетании с другим лечением злокачественной опухоли или иммунотерапевтическим средством.

Другой целью изобретения является сочетание белка согласно изобретению и другого лечения злокачественной опухоли или другого иммунотерапевтического средства для лечения или для применения при лечении злокачественной опухоли.

В одном варианте осуществления изобретения указанным иммунотерапевтическим средством является противоопухолевая вакцина.

В другом варианте осуществления изобретения указанным иммунотерапевтическим средством является иммуностимулирующее антитело.

Не имея намерения быть связанными с какой-либо теорией, авторы изобретения полагают, что белок согласно изобретению будет предотвращать иммуносупрессию в опухолевом окружении, тем самым повышая эффективность иммунотерапевтического средства.

Различные злокачественные опухоли можно лечить с применением настоящего изобретения, такие как адренокортикальная карцинома, рак анального канала, рак мочевого пузыря, опухоль головного мозга, глиома, карцинома молочной железы, карционидная опухоль, рак шейки матки, карцинома ободочной кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак внепеченочных желчных протоков, опухоль Эвинга,

экстракраниальная герминогенноклеточная опухоль, рак глаз, рак желчного пузыря, рак желудка, герминогенноклеточная опухоль, гестационная трофобластическая опухоль, рак головы и шеи, гипофарингеальный рак, карцинома островковых клеток, рак почки, рак гортани, лейкоз, рак губ и ротовой полости, рак печени, рак легкого, лимфома, меланома, мезотелиома, карцинома из клеток Меркеля, метастатический плоскоклеточный рак головы и шеи, миелома, неоплазма, рак носоглотки, нейробластома, рак ротовой полости, рак рта и глотки, остеосаркома, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак пазух и носовой полости, рак паращитовидной железы, рак пениса, феохромоцитома, рак гипофиза, неоплазма плазматических клеток, рак простаты, рабдомиосаркома, рак прямой кишки, почечноклеточная карцинома, рак слюнных желез, рак кожи, саркома Капоши, Т-клеточная лимфома, саркома мягких тканей, рак желудка, рак семенников, тимома, рак щитовидной железы, рак уретры, рак матки, рак влагалища, рак вульвы или опухоль Вильмса.

Подходящие опухолевые антигены для применения в качестве противоопухолевой вакцины, известные в данной области, включают, например, (а) раково-семенниковые антигены, такие как NY-ESO-1, SSX2, SCP1, а также полипептиды семейств RAGE, BAGE, GAGE и MAGE, например GAGE-1, GAGE-2,

MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6 и MAGE-12 (которые можно использовать, например, по отношению к меланоме, опухолям легкого, головы и шеи, NSCLC, молочной железы, желудочно-кишечного тракта и мочевого пузыря), (b) мутантные антигены, например p53 (ассоциированный с различными солидными опухолями, например раком прямой и ободочной кишки, легкого, головы и шеи), p21/Ras (ассоциированный, например, с меланомой, раком поджелудочной железы и раком прямой и ободочной кишки), CD 4 (ассоциированный, например, с меланомой), MUM 1 (ассоциированный, например, с меланомой), каспаза-8 (ассоциированный, например, с раком головы и шеи), CIA 0205 (ассоциированный, например, с раком мочевого пузыря), HLA-A2-R1701, β-катенин (ассоциированный, например, с меланомой), TCR (ассоциированный, например, с Т-клеточной неходжкинской лимфомой), BCR-abl (ассоциированный, например, с хроническим миелогенным лейкозом), триозофосфатизомераза, IA 0205, CDC-27 и LDLR- FUT, (c) сверхэкспрессируемые антигены, например галектин 4 (ассоциированный, например, с раком прямой и ободочной кишки), галектин 9 (ассоциированный, например, с болезнью Ходжкина), протеаза 3 (ассоциированная, например, с хроническим миелогенным лейкозом), WT 1 (ассоциированный, например, с различными лейкозами), карбоангидраза (ассоциированная, например, с раком почек), альдолаза A (ассоциированная, например, с раком легкого), PRAME (ассоциированный, например, с меланомой), HER-2/neu (ассоциированный, например, с раком молочной железы, ободочной кишки, легкого и яичника), α-фетопротеин (ассоциированный, например, с гепатомой), SA (ассоциированный, например, с раком прямой и ободочной кишки), гастрин (ассоциированный, например, с раком поджелудочной железы и желудка), каталитический белок теломеразы, MUC-1 (ассоциированный, например, с раком молочной железы и яичника), G-250 (ассоциированный, например, с почечноклеточной карциномой) и карциноэмбриональный антиген (ассоциированный, например, с раком молочной железы, раком легкого и злокачественными опухолями желудочно-кишечного тракта, такими как рак прямой и ободочной кишки), (d) перекрестно-реагирующие антигены, например антигены меланомы-дифференцировки меланоцитов, такие как MART-l/Melan A, gp100, MC1R, рецептор меланоцитостимулирующего гормона, тирозиназа, родственный тирозиназе белок-1/TRP1 и родственный тирозиназе белок-2/TRP2 (ассоциированный, например, с меланомой), (e) ассоциированные с простатой антигены, такие как PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P1, PSM-P2, ассоциированные, например, с раком простаты, (f) идиотипы иммуноглобулина (ассоциированные, например, с меланомой и B-клеточными лимфомами), и (g) другие опухолевые антигены, такие как содержащие полипептиды и сахариды антигены, включая (i) гликопротеиды, такие как сиалил-Tn и сиалил-Le<x> (ассоциированный, например, с раком молочной железы и раком прямой и ободочной кишки), а также различные муцины; гликопротеиды могут быть связаны с белком-носителем (например, MUC-1 может быть связан с LH); (ii) липополипептиды (например, MUC-1, связанный с липидным компонентом); (iii) полисахариды (например, синтетический гексасахарид Globo H), который может быть связан с белками-носителями (например, с KLH), (iv) ганглиозиды, такие как GM2, GM12, GD2, GD3 (ассоциированные, например, с раком головного мозга, раком легкого, меланомой), которые также могут быть связаны с белками-носителями (например, KLH). Другие опухолевые антигены включают pi 5, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, антигены вируса Эпштейна-Барр, EBNA, антигены вируса папилломы человека (HPV), включая E6 и E7, антигены вирусов гепатита B и C, антигены Т-лимфотропного вируса человека, TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H 1, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, p 16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV 18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (Mac-2-связывающий белок/циклофилин C-ассоциированный белок), TAAL6, TAG72, TLP, TPS и т.п.

Подходящие иммуностимулирующие антитела включают без ограничения анти-CTLA-4-, анти-PD1-, анти-PDL1- и анти-KIR-антитела.

В одном варианте осуществления изобретения способ лечения злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включает в себя введение субъекту белка согласно изобретению перед, одновременно и/или после другого противоракового средства или лечения злокачественной опухоли, такого как химиотерапевтическое лечение.

Другой целью настоящего изобретения является способ профилактики инфекционных заболеваний, таких как ВИЧ, малярия или эбола, или улучшения вакцинации против таких инфекций, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества белка согласно изобретению.

В одном варианте белок согласно изобретению можно использовать in vitro или in vivo для идентификации образцов, тканей, органов или клеток, которые экспрессируют GARP.

Примеры анализов, в которых можно использовать белок согласно изобретению, включают без ограничения, ELISA, ELISA типа "сэндвич", РИА, FACS, иммуногистохимию тканей, Вестерн-блот и иммунопреципитацию.

В одном варианте осуществления изобретения образец является биологическим образцом. Примеры биологических образцов включают без ограничения жидкости организма, предпочтительно кровь, более предпочтительно сыворотку крови, плазму, синовиальную жидкость, жидкость бронхоальвеолярного

лаважа, слюну, лимфу, асцитные жидкости, мочу, амниотическую жидкость, перитонеальную жидкость, спинномозговую жидкость, плевральную жидкость, перикардиальную жидкость и альвеолярные макрофаги, лизаты и экстракты тканей, полученные из пораженных заболеванием тканей.

В одном варианте осуществления изобретения подразумевается, что термин "образец" означает образец, взятый у индивидуума перед любым анализом.

В другом варианте белок согласно изобретению можно метить для диагностических целей и целей выявления. Под термином "меченый" в настоящем описании подразумевают, что соединение имеет по меньшей мере один связанный элемент, изотоп или химическое соединение, позволяющее выявлять соединение. Примеры меток включают без ограничения изотопные метки, такие как радиоактивные или тяжелые изотопы; магнитные, электрические или термальные метки и окрашенные или люминесцентные красители. Например, комплексы лантанидов, квантовые точки, флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метил-кумарины, пирен, малахитовый зеленый, стилбен, желтый люцифер, каскад синий, техасский красный, красители alexa, красители cy.

Одной целью изобретения является способ идентификации активированных Treg в образце на основе применения белка согласно изобретению.

Другой целью изобретения является способ идентификации растворимого или находящегося в комплексе латентного TGF-β на основе применения белка согласно изобретению.

Другой целью изобретения является набор, содержащий по меньшей мере один белок согласно изобретению.

Под термином "набор" подразумевают любое изделие производства (например, упаковку или емкость), содержащее по меньшей мере один реагент, т.е. например, антитело, для специфичного выявления экспрессии GARP. Набор может быть произведен, распространен или продан как единое целое для осуществления способов согласно настоящему изобретению. Кроме того, любой или все реагенты в наборе могут быть предоставлены в емкостях, которые защищают их от окружающей среды, например, в герметично закрытых емкостях. Наборы также могут содержать вкладыш в упаковку, в котором описан набор и способы его применения.

Наборы для осуществления способов ELISA типа "сэндвич" согласно изобретению обычно содержат улавливающее антитело, необязательно иммобилизованное на твердой подложке (например, планшете для микротитрования), и антитело для выявления, связанное с регистрируемым веществом, таким как, например, HRP, флуоресцирующая метка, радиоизотоп, β-галактозидаза и щелочная фосфатаза.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - новые моноклональные антитела, которые распознают GARP человека на клеточной поверхности. Мышиные Т-клетки BW5147, трансфицированные или не трансфицированные GARP человека (hGARP), красили биотинилированными >hGARP-антителами собственного получения (MHGARP 1-9) и стрептавидином-PE (SA-PE, верхние панели) или коммерческим анти-hGARP-антителом (клон Plato-1) и вторым антителом против IgG2b мыши, связанным с AlexaFluor 488 (AF488, нижние панели).

Фиг. 2 - MHGARP8 ингибирует продукцию активного TGF-β клоном Treg человека. Клон Treg A1 стимулировали в течение 24 ч >CD3/CD28-антителами, отдельно или в присутствии указанных >hGARP-мАт (20 мкг/мл). (A) Клеточные лизаты анализировали с помощью WB, используя >pSMAD2-антитела и антитела к >β-актину. (B) Количественная оценка сигналов ECL для WB, показанного на фиг. A.

Фиг. 3.

(A) - области в белке hGARP, необходимые для связывания >hGARP-антителами. Мышиные Т-клетки BW5147, экспрессирующие HA-меченные белки, показанные на схеме слева, красили, используя >hGARP-антитела (MHGARP 1-9, которые указаны на фигуре сверху) или >HA-антитела, и анализировали, используя проточную цитометрию. Гистограммы получены на живых клетках. На основании результатов FACS идентифицировали области, необходимые для связывания различных MHGARP-мАт, и такие области указаны горизонтальными столбиками вверху изображений HA-меченых химер;

(B) - относительное количество эпитопа, узнаваемого MHGARP-8, увеличивается при сверхэкспрессии TGF-β1. Исходные Т-клетки BW514 7 (BW нетрансфицированные) или клоны, стабильно трансфицированные только hGARP (BW + hGARP) или с hTGFB1 (BW + hGARP + hTGF-b1) красили, как указано в описании к фиг. A или с использованием антител >mLAP-AF647 или >hLAP-APC и анализировали с применением проточной цитометрии;

(C) - MHGARP-1, -2, -3, -4 и -5 узнают свободный hGARP, но не hGARP, связанный с TGF-β1. Клеточные лизаты из исходных Т-клеток BW5147 или клона, стабильно трансфицированного hGARP и hTGFB1, иммунопреципитировали с использованием >hGARP-мАт (MHGARP 1-9, как указано на фигуре сверху). Клеточные лизаты (ввод 30%) или продукты IP анализировали на Вестерн-блоте с использованием коммерческого >hGARP-мАт (клон Plato-1, верхние панели) и антитела, направленного против С-концевого эпитопа TGF-β1, которое выявляет про-TGF-β1 в виде полосы 50 кД и зрелый TGF-β1 в виде полосы 13 кД (нижние панели). * Специфичный продукт, выявляемый в нетрансфицированных клетках;

(D) - сверхэкспрессия hTGFB1 в hGARP-трансфицированных клетках 293T уменьшает связывание MHGARP-1, -2, -3, -4 и -5, но увеличивает связывание MHGARP-8. Клетки 293T котрансфицировали

hGARP-кодирующей плазмидой (0,25 мкг), указанными количествами hTGFB1-кодирующей плазмидой и пустой плазмидой, доводя общее количество трансфицируемой ДНК до 2,5 мкг при всех условиях. Трансфицированные клетки красили >hGARP-мАт (MHGARP 1-9, как указано на фигуре сверху) и анализировали с применением проточной цитометрии;

(E) - сайленсинг hTGFB1 в hGARP-трансдуцированных клетках JURKAT уменьшает связывание MHGARP-8. Клетки JURKAT, трансдуцированные или не трансдуцированные hGARP, трансфицировали ми-РНК, специфичной по отношению к мРНК TGFB1 (siTGFB1) или контрольной смешанной ми-РНК. Трансфицированные клетки красили >hGARP-мАт (MHGARP 1-9, как показано на фигуре сверху) или >hLAP-антителом и анализировали с применением проточной цитометрии.

Фиг. 4 - презентация hTGF-β1 на клеточной поверхности не достаточна для связывания MHGARP8. Клетки 293T трансфицировали, как указано ниже, красили >hLAP-антителами или MGARP8, затем анализировали с применением проточной цитометрии;

(A) - трансфекция конструкциями, кодирующими HA-меченные белки, схематично показанными слева, без конструкции hTGFB1;

(B) - котрансфекция конструкциями, кодирующими HA-меченные белки, схематично показанные слева, с конструкцией hTGFB1.

Фиг. 5 - связывание MHGARP-2, -3 и -8 требует аминокислот 137-138-139 hGARP. Исходные Т-клетки BW514 7 (BW нетрансфицированные) или клоны, стабильно трансфицированные плазмидами, кодирующими HA-меченные формы hGARP, красили указанными >hGARP- или >HA-антителами и анализировали с применением проточной цитометрии. HA-меченные формы hGARP, тестированные в данном случае, содержали аминокислоты 20-662 hGARP (дикий тип, WT) или аминокислоты 20-662 hGARP, в котором группы из 3 аминокислот, локализованные в области 101-141, заменяли аминокислотами, встречающимися в соответствующей области mGARP (Mut I, Mut II и Mut III). Аминокислотные последовательности области 101-141 hGARP -WT, -Mut I, -Mut II, -Mut III и mGARP указаны слева. Аминокислоты, которые различаются в GARP человека и мыши, выделены серыми вертикальными прямоугольниками, а аминокислоты, мутантные в Mut I, Mut II и Mut III, указаны черными горизонтальными прямоугольниками.

Фиг. 6 - MHGARP8 ингибирует функцию Treg in vivo. В 0 день указанные группы мышей NSG получали внутривенные инъекции PBMC человека в сочетании или без Treg человека. Мышей из групп III и IV обрабатывали антителом MHGARP8, которое инъецировали внутрибрюшинно один раз в неделю, начиная с -1 дня. Объективные признаки развития GvHD у реципиентных мышей контролировали раз в две недели. Оценку GvHD устанавливали на основе потери массы (0: <10%; 1: 10%-20%; 2: >20%; 3: >30%), анемии (0: красный или розовый хвост; 1: белый хвост), положения тела (0: нормальное; 1: сгорбленное), общей активности (0: нормальная; 1: ограниченная), потери шерсти (0: нет потери шерсти; 1: потеря шерсти) и желтухи (0: белый или красный хвост; 1: желтый хвост). Максимальная тяжесть заболевания или гибель соответствовали оценке 7. (A) Эксперимент 1. Значения представляют собой средние оценки. (B) Эксперимент 2. Значения представляют собой средние оценки + SEM.

Фиг. 7 - новые анти-hGARP-мАт. (A) Схематичное представление экспериментальных методик, используемых для получения анти-hGARP-мАт. (B) Проточно-цитометрические анализы клона ThA2 (Th-клетки CD4+ человека, которые не экспрессируют hGARP) или клеток ThA2, трансдуцированных hGARP, после окрашивания биотинилированными мАт MHG-1 - MHG-14 и стрептавидином, связанным с PE (SA-PE), с использованием мАт LHG-1 - LHG-17 и второго анти-hIgG1-антитела, связанного с PE, или с использованием коммерчески доступного мышиного анти-hGARP-мАт (клон Plato-1) и второго анти-mIgG2b-антитела, связанного с AF647.

Фиг. 8 - иммунные ответы у иммунизированных лам. На фиг. (A) показаны иммунные ответы у лам, иммунизированных ДНК. На фиг. (B) показаны иммунные ответы у лам, иммунизированных клетками BW, экспрессирующими hGARP/hTGFβ.

Фиг. 9 - перекрестная реактивность с GARP-TGFβ макак-крабоедов, измеренная на клетках с использованием FACS. Клетки 293E трансфицировали GARP человека/макак-крабоедов и TGFB человека/макак-крабоедов. LHG-10-D и оптимизированные по аффинности варианты являются перекрестно реактивными с GARP-TGFB макак-крабоедов.

Фиг. 10 - последовательности антител LHG-10 и их перетасованных вариантов.

Фиг. 11 - MHGARP8 и LHG-10 ингибируют продукцию активного TGF-β в Treg человека. После короткого размножения in vitro клетки CD4+CD25hiCD127lo человека (Treg) повторно стимулировали покрытыми анти-CD3/CD28 шариками в течение 24 ч в присутствии или в отсутствие указанных мАт (10 мкг/мл). Клеточные лизаты анализировали на Вестерн-блоте с использованием антител против фосфорилированного SMAD2 (pSMAD2) в качестве показателя продукции активного TGF-β или β-актина (контроль загрузки).

Фиг. 12 - MHGARP8 и LHG-10 ингибируют супрессорную активность Treg человека in vitro. (A) Свежевыделенные клетки CD4+CD25-CD127hi человека (Th; 2×10^4 на микролунку) высевали отдельно или с клоном Treg A1 (Stockis, J. et al. Eur. J. Immunol. 2009, 39: 869-882) в соотношении 1/1 Treg к Th.

Клетки стимулировали покрытыми анти-CD3 шариками и растворимым анти-CD28 в присутствии или в отсутствие указанных анти-hGARP-мАт (10 мкг/мл). 3H-тимидин (3H-Thy) добавляли в последние 16 ч 4-дневной культуры и включение измеряли в сцинтилляционном счетчике в качестве показателя пролиферации. Столбчатые гистограммы показывают тыс. имп./мин (среднее из трех повторов + SD). Клон Treg A1 не пролиферировал в отсутствие Th-клеток (только Treg: 0,5±0,04 тыс. имп./мин). Супрессия пролиферации Th в присутствии Treg указана над каждым черным столбиком и вычислена следующим образом: % супрессии = 1- (тыс. имп./мин (только Th)/тыс. имп./мин (Th + Treg). (B) Клетки клона ThA2 (Th; 1×10^4 на микролунку) высевали с клоном Treg A1 в указанных соотношениях Treg к Th в присутствии или в отсутствие MHGARP8 (MHG-8), анти-hTGF-β1-мАт (клон 1D11) или контроля изотипа (mIgG1). Стимуляцию, измерение пролиферации и вычисление осуществляли, как описано к фиг. A.

Фиг. 13 - формы и области GARP, связанного анти-GARP-мАт.

(A) Схематичное представление GARP и комплексов GARP/TGF-β. Белок GARP показан толстой изогнутой серой линией. Номера указывают положения аминокислот. TGF-β представлен с ассоциированным с латентностью пептидом (LAP) толстыми черными линиями, и зрелый пептид TGF-β1 указан толстыми прямыми серыми линиями. Тонкие черные линии указывают межцепочечные дисульфидные связи.

(B) Классификация анти-hGARP-мАт на основе требований к их связыванию.

Фиг. 14 - три группы анти-hGARP-мАт связывают свободный GARP отдельно, свободный GARP и комплексы GARP/TGF-β1 или комплексы GARP/TGF-β1 отдельно соответственно. (A) Клеточные лизаты клеток BW, трансфицированных hGARP и hTGFB1, иммунопреципитировали указанными анти-hGARP-мАт. Общие лизаты (BW+hGARP+hTGFB1 или нетрансфицированные контроли) и продукты IP анализировали на Вестерн-блоте с использованием антител против hGARP (клон Plato-1), LAP или зрелого пептида TGF-β. (B) Проточно-цитометрические анализы клеток 293T, нетрансфицированных или трансфицированных hGARP, hTGFB1 или и тем, и другим и окрашенных, как указано анти-LAP-APC, биотинилированными MHG-мАт и стрептавидином-PE, клон Plato-1 и >mIgG2b-AF647 или LHG-мАт и >hIgG1-PE.

Фиг. 15 - аминокислоты hGARP, необходимые для связывания MHG и LHG-мАт. (A) Проточно-цитометрические анализы клеток 293T, трансфицированных плазмидами, кодирующими HA-меченные химеры mGARP/hGARP, схематично представленные слева (номера означают положения аминокислот в hGARP). Клетки красили биотинилированными MHG-мАт и стрептавидином-PE, LHG-мАт и >hIgG1-PE, или анти-HA и >mIgG1-AF647. hTGFB1 котрансфицировали химерами mGARP/hGARP для анализов мАт, которые связывают только комплексы hGARP/hTGF-β1 (LHG-3, MHGARP8 (MHG-8), LHG-10). (B) Как указано выше, за исключением того, что клетки 293T трансфицировали плазмидами, кодирующими мутантные формы полноразмерного HA-меченого hGARP. В каждом мутанте 3 аминокислоты hGARP заменены 3 аминокислотами, встречающимися в mGARP, как показано на выравнивании слева (номера означают положения аминокислот в hGARP).

Фиг. 16 - ингибирование функции Treg человека при действии анти-hGARP in vivo. (A) Показан протокол в 0 день, указанные группы мышей NSG получали внутривенные инъекции PBMC человека в сочетании или без Treg человека. На фиг. (B) показаны результаты 4 независимых экспериментов (I-IV), выполненных с использованием клеток от доноров A, B или C с указанием количества мышей на группу (n). Днем появления заболевания является день, когда средняя оценка заболевания становится ≥1, и день указан для 3 экспериментальных групп, в которых мышам трансплантировали только PBMC (группа a), PBMC и Treg (группа b) или PBMC и Treg и обрабатывали с использованием MHGARP8 (MHG-8) (группа c). (C) Подробные результаты эксперимента IV, показывающие изменение средней оценки заболевания (слева) и кривые выживаемости (справа) в указанных группах мышей. Статистическую значимость различий между группами b (PBMC + Treg) и c (PBMC + Treg + MHG-8) вычисляли, используя 2-факторный анализ Anova для оценок прогрессирования заболевания (p=0,0001) и логарифмический ранговый критерий (Мантеля-Кокса) для выживаемости (p=0,0027).

Примеры

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано на следующих примерах.

Пример 1. Новые моноклональные антитела, направленные против GARP человека (>hGARP-моноклональные).

Мышей DBA/2 или Balb/c иммунизировали мышиными клетками P1HTR, трансфицированными GARP человека. Сыворотку от иммунизированных мышей тестировали в отношении присутствия >hGARP-антител посредством скрининга связывания с hGARP-экспрессирующими клетками BW в FACS. Спленоциты от мышей с высокими титрами >hGARP-антител сливали с клетками SP2/neo. Гибридомы отбирали в среде HAT и клонировали при лимитирующем разведении. Надосадки ± 1600 клонов гибридом подвергали скринингу с использованием FACS в отношении присутствия антител, связывающихся с hGARP-экспрессирующими клетками BW. При таком скрининге авторы идентифицировали 38 клонов, продуцирующих моноклональные >hGARP-антитела. Было отобрано девять клонов и размножено для крупномасштабной продукции и очистки 9 новых моноклональных >hGARP-антител (MHGARP

1-9).

Как показано на фиг. 1, MHGARP 1-9 связываются с мышиными клетками BW5147, трансфицированными hGARP, но не связываются с нетрансфицированными клетками. MHGARP 1-9 также связываются с клетками 293T, трансфицированными hGARP, и двумя линиями Т-клеток человека (клон Th A2 и Jurkat), трансдуцированными hGARP-кодирующим лентивирусом, но не с соответствующими исходными клетками (не показано). Такая картина узнавания идентична картине узнавания коммерчески доступным >hGARP-мАт (клон Plato-1), используемым в настоящем эксперименте в качестве позитивного контроля. Полученные результаты показывают, что MHGARP 1-9 узнают hGARP на клеточной поверхности.

Как показано на фиг. 7, было получено и очищено 5 дополнительных антител MHGARP. Антитела MHGARP (MHG-1 - MHG-14 на фигуре) не связывают клон ThA2 (хелперные Т-клетки CD4+ человека, которые не экспрессируют hGARP), но связывают ThA2, трансдуцированные hGARP.

Пример 2. MHGARP8 ингибирует продукцию активного TGF-β клетками Treg человека, тогда как 12 других моноклональных >hGARP-антител не оказывают ингибирующего действия.

Клон Treg человека (1E+06 клеток/мл) стимулировали в бессывороточной среде нанесенными в виде покрытия анти-CD3-антиетлами (1 мкг/мл) и растворимыми анти-CD28-антителами (1 мкг/мл) в присутствии или в отсутствие 20 мкг/мл моноклонального >hGARP-антитела. В таком анализе тестировали тринадцать моноклональных >hGARP-антител: 9 новых моноклональных антител, полученных авторами (MHGARP 1-9) и коммерчески доступные клоны антител Plato-1 (Enzo Life Sciences, № в каталоге ALX-804-867), 272G6 (Synaptic Systems, № в каталоге 221111), 50G10 (Synaptic Systems, № в каталоге 221011) и 7B11 (BioLegend, № в каталоге 352501). Клетки собирали через 24 ч, лизировали и вносили в SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях. Гели подвергали блоттингу на нитроцеллюлозные мембраны, используя систему iBlot (Life Technologies). После блокирования мембраны гибридизовали с первыми антителами, направленными против фосфорилированного SMAD2 (pSMAD2, Cell Signaling Technologies) или β-актина (SIGMA), затем гибридизовали со вторыми связанными с HRP антителами и выявляли, используя субстрат с усиленной хемилюминесценцией (ECL) (ThermoFisher Scientific). Присутствие pSMAD2 свидетельствует о продукции активного TGF-β1 стимулированным клоном Treg. Сигналы ECL количественно оценивали, измеряя плотность полос pSMAD2 55 кД и β-актина 40 кД на радиоавтограммах, используя компьютерную программу Image J.

Чтобы исследовать, требуется ли hGARP для продукции активного TGF-β TCR-стимулированными клетками Treg, авторы стимулировали клон Treg человека через их Т-клеточный рецептор (TCR) отдельно или в присутствии >hGARP-мАт. Активный TGF-β, продуцируемый стимулированными Treg, запускает аутокринный сигнал, который приводит к фосфорилированию и активации факторов транскрипции SMAD2 и SMAD3. Авторы измеряли присутствие фосфорилированного SMAD2 (pSMAD2) на Вестерн-блоте (WB) в качестве показателя продукции активного TGF-β стимулированным клоном Treg. Как показано на фиг. 2, pSMAD2 был снижен более чем в 10 раз в присутствии MHGARP8. Такое снижение сходно со снижением, наблюдаемым в присутствии анти-TGF-β-мАт, используемым в данном случае в качестве положительного контроля. Ни одно из 12 других >hGARP-мАт (8 других полученных собственными силами MHGARP и 4 коммерчески доступных анти-GARP-антитела) не ингибировали продукцию активного TGF-β клоном Treg. В целом, полученные авторами данные показывают, что GARP необходим для продукции активного TGF-β клетками Treg человека, так как MHGARP8, антитело, направленное против hGARP, предотвращало продукцию активного TGF-β.

Пример 3. MHGARP8, но не другие >hGARP-мАт, узнает конформационный эпитоп, который требует присутствия TGF-β.

Картирование областей, узнаваемых моноклональными >hGARP-антителами.

Мышиные Т-клетки BW5147 подвергали электропорации с использованием плазмид, кодирующих HA-меченные белки, схематично представленные на фиг. 3A, соответствующие hGARP, mGARP или химерам mGARP/hGARP. Стабильные клоны, отобранные на неомицине, красили биотинилированными анти-hGARP-антителами (>hGARP 1-9) и стрептавидином-PE, коммерческим анти-hGARP-антителом (клон Plato-1) и вторым анти-mIgG2b-AF488, или анти-HA-антителом и вторым антителом против IgG1 мыши-AF488. Гистограммы получали, пропуская живые клетки. Черные гистограммы показывают сигналы на нетрансфицированных клетках BW, белые гистограммы показывают сигналы на клетках BW, экспрессирующих HA-меченый hGARP, и серые гистограммы показывают сигналы на клетках BW, экспрессирующих HA-меченый mGARP или химеры mGARP/hGARP.

Исходные Т-клетки BW5147 (BW нетрансфицированные) или клоны, стабильно трансфицированные только hGARP (BW + hGARP) или hTGFB1 (BW + hGARP + hTGF-β1), красили биотинилированными анти-hGARP-антителами (>hGARP 1-9) и стрептавидином-PE, коммерческим анти-hGARP-антителом (клон Plato-1) и вторым анти-mIgG2b-AF488, или >mLAP-AF647- или >hLAP-APC-антителами.

Авторы исследовали механизм, посредством которого MHGARP8, но не другие >hGARP-мАт, ингибирует продукцию активного TGF-β клетками Treg. Авторы выдвинули гипотезу, что MHGARP8 может узнавать эпитоп в hGARP, который отличается от эпитопов, узнаваемых другими >hGARP-мАт.

За исключением MHGARP-1, полученные авторами MHGARP-мАт не узнают мышиный GARP

(mGARP). Поэтому авторы сконструировали плазмиды, кодирующие HA-меченый hGARP, mGARP или химеры hGARP/mGARP, чтобы картировать области hGARP, узнаваемые полученными авторами мАт. Авторы трансфицировали клетки BW мышей и получили стабильные клоны, экспрессирующие HA-меченные белки (схематично представленные на фиг. 3). Все клоны экспрессировали сходные уровни HA-меченого белка на поверхности, как показано на основании сходных интенсивностей флуоресценции после окрашивания >HA-мАт (фиг. 3A). Как предполагалось, все MHGARP-мАт связывались с клоном, экспрессирующим HA-меченый hGARP, тогда как ни одно из антител, за исключением MHGARP-1, не связывалось с клоном, экспрессирующим HA-меченый mGARP. Четыре группы мАт получали после анализа связывания с HA-мечеными химерами hGARP/mGARP (фиг. 3A). Моноклональные антитела в первой группе (MHGARP-6, -7 и -9) не связываются с химерами, что свидетельствует о том, что они узнают эпитоп, локализованный между аминокислотами 20 и 101 в hGARP (область 20-101). мАт во второй группе (MHGARP-2, -3 и -8) связываются только с 1 из 5 химер и, следовательно, узнают эпитоп в области 101-141. Третья группа включает MHGARP-5, которое связывается с 2 химерами и, следовательно, узнает область 141-207. Такая группа, вероятно, также включает MHGARP-1, которое перекрестно взаимодействует, но связывает такие 2 химеры более эффективно, чем связывают mGARP или 3 другие химеры. Наконец, мАт в четвертой группе (MHGARP-4 и Plato-1) связывают 4 из 5 химер и, следовательно, узнают область 265-333.

На основании вышесказанного авторы сгруппировали >hGARP-мАт в 4 семейства антител, которые узнают 4 разных области hGARP-белка. MHGARP-8, которое проявляет нейтрализующую активность, связывается с областью 101-141. Такая область также распознается антителами MHGARP-2 и -3, которые не являются нейтрализующими. Таким образом, способность связывать область 101-141 не является достаточной для придания нейтрализующей активности.

Чтобы дополнительно уточнить эпитопы, узнаваемые антителами MHGARP-2, -3 и -8, авторы сравнили связывание >hGARP-антител с клонами клеток BW, экспрессирующими только hGARP (BW+hGARP) или hGARP и hTGF-β1 (BW+hGARP+hTGF-β1). За исключением MHGARP8 все >hGARP-антитела красили BW+hGARP+hTGF-β1 с такой же интенсивностью, что и BW+hGARP, что свидетельствует о том, что два клона экспрессируют одинаковые уровни hGARP на клеточной поверхности. Напротив, антитело MHGARP8 красило BW+hGARP+hTGF-β1 более интенсивно, чем BW+hGARP (фиг. 3B). Полученные данные показывают, что несмотря на то, что уровни hGARP сходны на двух клонах, эпитоп, узнаваемый MHGARP8, более широко представлен на клетках BW+hGARP+hTGF-β1, чем на BW+hGARP.

Приемлемым объяснением такого наблюдения является то, что эпитоп был узнаваем антителом MHGARP8, по-видимому, только тогда, когда hGARP связывался с мышиным (m) или человеческим (h) TGF-β1. Это может быть следствием одного из двух механизмов: один из эпитопов содержит аминокислоты как из hGARP, так и из TGF-β1 (смешанный конформационный эпитоп), или он содержит аминокислоты только из hGARP, но принимает другую конформацию в присутствии TGF-β1 (индуцируемый связыванием конформационный эпитоп). Клетки BW экспрессируют мышиный TGF-β1, и мышиный TGF-β1 связывается с hGARP (фиг. 3B). Таким образом, связывание MHGARP8 с BW+hGARP (в отсутствие трансфицированного hTGF-β1) может быть следствием узнавания комплексов hGARP/mTGF-β1.

Чтобы проверить гипотезу о том, что MHGARP8 узнает GARP в том случае, когда он связан с TGF-β1, авторы провели эксперименты по коиммунопреципитации. Авторы использовали разные анти-GARP-антитела, чтобы иммунопреципитировать GARP из клеток BW+hGARP+hTGF-β1, затем проверяли, подвергается ли TGF-β коиммунопреципитации с GARP. Как показано на фиг. 3C, все анти-GARP-антитела эффективно иммунопреципитировали GARP (фиг. 3C, верхние панели). Коиммунопреципитацию TGF-β1 наблюдали в случае мАт MHGARP-6, -7, -8 и -9, что свидетельствует о том, что такие антитела связывают GARP, связанный с TGF-β1. Напротив, MHGARP-1, -2, -3, -4 и -5 иммунопреципитировали GARP также эффективно, как и другие анти-GARP-мАт, но они не коиммунопреципитировали TGF-β (фиг. 3C, нижние панели). Полученные данные свидетельствуют о том, что MHGARP-1, -2, -3, -4 и -5 узнают свободный GARP, но не узнают GARP, который связан с TGF-β. Важно отметить, что MHGARP-2 и -3, которые требуют области GARP101-141 для связывания, узнают только свободный GARP, тогда нейтрализующее антитело MHGARP8, которое также требует $GARP_{101-141}$, узнает GARP, связанный с TGF-β.

Чтобы подтвердить такое наблюдение, авторы использовали клетки 293T, которые экспрессируют низкие уровни эндогенного TGF-β1, чтобы котрансфицировать hGARP с возрастающими количествами hTGFB1 (фиг. 3D). Связывание MHGARP-1, -2, -3, -4 и -5 снижалось в зависимости от дозы, когда hTGFB1 котрансфицировали с hGARP. Такой эффект полностью исключался при самых высоких дозах hTGFB1. Полученные данные подтверждают, что MHGARP 1-5 связывают только свободный GARP. Связывание MHGARP-6, -7 и -9 не модифицировалось при котрансфекции hTGFB1, что свидетельствует о том, что такие мАт связывают hGARP, независимо от того, связан ли он или нет с TGF-β1 (т.е. они связывают как свободный GARP, так и GARP, связанный с TGF-β1). Напротив, связывание MHGARP8 возрастало в зависимости от дозы, когда hTGFB1 котрансфицировали с hGARP. Это снова свидетельствует

о том, что в отличие от всех других антител MHGARP8 не связывает свободный GARP, а связывает только GARP, связанный с TGF-β1.

Чтобы продемонстрировать, что связывание MHGARP8 требует присутствия TGF-β1, авторы использовали ми-РНК, чтобы вызвать сайленсинг экспрессии TGFB1 в клетках Jurkat, трансдуцированных hGARP (фиг. 3E). Ми-РНК против мРНК TGFB1 эффективно снижала экспрессию TGF-β1, как показано по снижению количества поверхностного LAP, выявляемого на клетках Jurkat+hGARP (фиг. 3E, правая панель). Пониженная экспрессия TGF-β1 в Jurkat+hGARP уменьшала связывание антитела MHGARP8, но не модифицировало связывание других анти-GARP-антител (фиг. 3E, гистограммы на переднем плане). Полученные данные подтверждают, что в отличие от других анти-GARP-антител MHGARP8 не связывает свободный GARP, а связывает только GARP в присутствии TGF-β1.

Наконец, авторы попытались исключить маловероятную гипотезу о том, что презентация TGF-β на клеточной поверхности, независимо от экспрессии hGARP, достаточна для связывания MHGARP8. Другими словами, авторы попытались продемонстрировать, что MHGARP8 узнает смешанный или индуцируемый связыванием конформационный эпитоп, который требует экспрессии как hGARP, так и TGF-β. Для этого авторы трансфицировали клетки 293T конструкциями, кодирующими hGARP, mGARP или химеры hGARP/mGARP, описанными выше, с конструкциями, кодирующими hTGF-β1, или без них. Трансфицированные клетки анализировали, используя FACS, чтобы измерить связывание антитела MHGARP8 и презентацию hTGFB1 на клеточной поверхности с использованием >hLAP-антитела (фиг. 4). По сравнению с нетрансфицированными клетками трансфекция конструкциями hGARP, mGARP или hGARP/mGARP отдельно (без hTGFB1) индуцировала низкие уровни поверхностного LAP вследствие низких уровней экспрессии эндогенного hTGFB1 (фиг. 4A, слева). Уровни поверхностного LAP сильно повышались при трансфекции hTGFB1 клеток, трансфицированных hGARP, mGARP или любой конструкцией hGARP/mGARP (фиг. 4B, левая гистограмма). Полученные данные свидетельствуют, что hTGF-β1 презентируется на клеточной поверхности за счет hGARP, mGARP и всех химер hGARP/mGARP. Важно, что MHGARP8 связывалось только с поверхностью клеток, трансфицированных hGARP или конструкциями hGARP/mGARP, кодирующими аминокислоты 101-141 hGARP (фиг. 4A и 4B, справа). Оно не связывалось ни с клетками, трансфицированными hTGFB1 и mGARP, ни с клетками, трансфицированными hTGFB1 и конструкциями hGARP/mGARP, которые не кодируют hGARP101-141 (фиг. 4B, справа), хотя такие клетки презентировали высокие уровни LAP на своей поверхности (фиг. 4B, слева). Полученные данные демонстрируют, что презентация TGF-β1 на клеточной поверхности (mGARP или химерами hGARP/mGARP) не достаточна для связывания MHGARP8. Для связывания MHGARP8 требуется присутствие как hGARP (область 101-141), так и TGF-β1 на клеточной поверхности.

Как указано выше, MHGARP8 не связывает mGARP. Связывание такого антитела с hGARP требует области, содержащей аминокислоты 101-141. Чтобы дополнительно уточнить эпитоп, узнаваемый MHGARP8, авторы сравнили последовательности области 101-141 в GARP человека и мыши. В указанной области только 13 аминокислот отличаются в hGARP и mGARP (фиг. 5, аминокислоты, выделенные серыми прямоугольниками). Авторы сконструировали 3 HA-меченных мутантных формы hGARP. В каждом мутанте (Mut I, Mut II и Mut III) 3 последовательные кислоты заменяли соответствующими аминокислотами белка mGARP (фиг. 5, черные прямоугольники). Авторы получили стабильные клоны клеток BW, трансфицированных такими HA-мечеными формами hGARP дикого типа (WT) или мутантного hGARP. Все клоны экспрессировали сходные уровни HA-меченого белка на поверхности, как показано на основании окрашивания >HA-антителом (фиг. 5, гистограммы справа). Затем авторы проанализировали клоны после окрашивания MHGARP-2, -3 и -8, т.е. антителами, которые требуют области 101-141 hGARP для связывания. Все три антитела связывались с клетками, экспрессирующими формы WT, Mut I и Mut II hGARP. Напротив, связывание было сильно снижено с клетками, экспрессирующими форму Mut III hGARP, что свидетельствует о том, что MHGARP-2, -3 и -8 требуют аминокислот 137-138-139 hGARP для связывания.

Данные авторов, вместе взятые, показывают, что MHGARP8 является единственным имеющимся анти-GARP-антителом, которое ингибирует продукцию активного TGF-β1 Treg человека. Такая нейтрализующая активность сопряжена со связыванием MHGARP8 с эпитопом, который отличается от эпитопов, связываемых всеми другими анти-GARP-антителами: связывание MHGARP8 требует как области 101-141 hGARP, так и присутствия hTGF-β, тогда как связывание не нейтрализующих антител требует других областей hGARP (в случае MHGARP-1, -4, -5, -6, -7 и -9) или происходит только в отсутствие TGF-β1 (в случае MHGARP-2 и -3). В области hGARP101-141 аминокислоты 137-139 необходимы для связывания MHGARP-2, -3 и -8.

Аффинность антитела MHGARP8 по отношению к иммобилизованному shGARP-TGFβ измеряли в анализе BIACOR: Kd для указанного антитела составляет 0,2 нМ.

Пример 4. MHGARP8 ингибирует функцию клеток Treg человека in vivo.

Чтобы исследовать, ингибирует ли MHGARP8 также Treg человека in vivo, авторы использовали модель ксеногенной GvHD, индуцированной переносом PBMC (мононуклеарных клеток периферической крови) человека мышам NOD-Scid-IL2Rg$^{-/-}$ (NSG) с иммунной недостаточностью. У мышей NSG отсут-

ствуют функциональные Т-, В- и NK-клетки. Это позволяет эффективно трансплантировать гематопоэтические стволовые клетки (HSC) человека, которые пролиферируют и образуют функциональную иммунную систему человека у мышей-реципиентов. Когда используют PBMC человека вместо HSC, происходит эффективная трансплантация Т-клеток, но она вскоре сопровождается развитием болезни ксеногенный трансплантат против хозяина (GvHD). В такой модели GvHD возникает в результате активности цитотоксических Т-лимфоцитов человека-донора, которые распознают ткани реципиентных мышей NSG как чужеродные (Shultz, et al. Nature 2012, 12: 786-798). Тяжесть GvHD может быть снижена в результате котрансфекции клеток Treg человека клетками PBMC человека (Hannon et al. Transfusion 2014).

PBMC человека выделяли из цельной крови донора с гемохроматозом центрифугированием в градиентах плотности (LymphoprepTM) и замораживали для последующего использования. Аутологичные Treg получали следующим образом: Т-клетки CD4+ выделяли из крови того же донора, используя смесь для обогащения Т-клеток CD4+ человека RosetteSepTM (StemCell Technologies), и красили анти-CD4-, анти-CD25- и анти-CD127-антителами, связанными с флуорохромами. Клетки CD4+CD25hiCD127lo сортировали, используя проточную цитометрию (чистота >99%), затем стимулировали шариками, покрытыми анти-CD3/CD28 (Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 for T-Cell Expansion and Activation, Life Technologies) в присутствии IL-2 (120 ед./мл) в течение 14 суток. Полученные размноженные клетки Treg замораживали для последующего использования.

Мышей NSG облучали (2,5 Гр) в -1 день, затем им в хвостовую вену инъецировали PBMC человека ($2{,}7\times10^6$ на мышь) отдельно или в смеси с размноженными Treg человека ($1{,}4\times10^6$ на мышь) в 0 день. Мыши также получали еженедельные внутрибрюшинные инъекции антитела MHGARP8 (400 мкг в -1 день (минус 1 день), по 200 мкг в более поздних временных точках) или контрольного PBS. Наблюдения за мышами проводили раз в две недели в отношении развития GvHD, как указано в тексте.

Авторы переносили PBMC человека вместе с Treg или без Treg мышам NSG, и мышей лечили внутрибрюшинными инъекциями антитела MHGARP8 или контрольного PBS. Большое количество клеток Treg человека, необходимых для переносов, получали, используя кратковременное размножение in vitro клеток CD4+CD25+CD127lo, отсортированных из PBMC человека с использованием проточной цитометрии. Объективные признаки развития GvHD у реципиентных мышей контролировали раз в две недели. Авторы провели два независимых эксперимента, которые дали сходные результаты. В эксперименте 1 (фиг. 6A) признаки GvHD (средняя оценка ≥1) появлялись через 29 дней после инъекции PBMC человека (группа I; n=2). Тяжесть заболевания быстро возрастала, и одну из 2 мышей подвергли эвтаназии по этическим причинам на 55 день. У мышей, которым инъецировали PBMC и Treg (группа II; n=3), появление GvHD было замедлено по сравнению с инъекцией только PBMC (средняя оценка λ1 была достигнута через 58 дней). Полученные данные свидетельствуют, что Treg, как и предполагали, частично защищали мышей NSG от GvHD. Важно, что обработка мышей, которые получали PBMC и Treg, антителом MHGARP8 (группа III, n=6) отягчала заболевание: признаки GvHD появлялись раньше (36 дней), чем у мышей в группе II. Влияние MHGARP8, по-видимому, зависит от присутствия Treg, так как не наблюдали различия в оценке заболевания между мышами, получавшими только PBMC (группа I) или PBMC и MHGARP8 (группа IV; n=4). Авторы повторили такой эксперимент с использованием большего количества мышей на группу (фиг. 6B). И снова совместная инъекция Treg и PBMC замедлял проявление GvHD по сравнению с введением только PBMC (46 день в группе II по сравнению с 28 днем в группе I), и обработка антителом MHGARP8 отягощала GvHD у мышей, получавших PBMC и Treg (28 день в группе III) по сравнению с необработанными мышами (46 день в группе II). Полученные данные, вместе взятые, показывают, что MHGARP8 ингибирует иммуносупрессорную функцию Treg человека in vivo.

Пример 5. Новые моноклональные анти-hGARP-антитела (мАт), полученные с использованием способа иммунизации лам.

Получение рекомбинантного растворимого комплекса GARP-TGFβ1.

Комплекс GARP-TGFβ1 человека и мыши получали в виде растворимого комплекса, используя укороченные конструкции, экспрессирующие GARP. Последовательность белка GARP человека укорачивали после лейцина 628, затем следовала отщепляемая метка TEV-3x strep

(EAAENLYFQGAAWSHPQFEKGAAWSHPQFEKGAAWSHPQFEKGAA*)

(SEQ ID NO: 40). Последовательность белка GARP мыши укорачивали после лейцина 629, затем следовала такая же отщепляемая метка TEV-3x strep. Комплексы GARP-TGFβ1 получали в результате коэкспрессии укороченного GARP и TGFβ1 в клетках HEK293E с последующей очисткой с использованием Strep-метки.

Иммунизация лам.

Иммунизацию лам и сбор лимфоцитов периферической крови (PBL), а также последующую экстракцию РНК и амплификацию фрагментов антител осуществляли, как описано De Haard с соавт. (De Haard H., et al., J. Bact. 187: 4531-4541, 2005). Четырех лам иммунизировали клетками BW, сверхэкспрессирующими GARP человека и TGF β1 (фиг. 7A), что было подтверждено проточной цитометрией с использованием моноклонального антитела MHGARP8 (MHG-8), описанного в настоящей заявке на выдачу патента. Лам иммунизировали, используя внутримышечные инъекции в шею один раз в неделю в те-

чение периода времени, составляющего шесть недель. Приблизительно 10^7 клеток инъецировали в мышцы шеи, а неполный адъювант Фрейнда инъецировали во вторую область, расположенную в нескольких сантиметрах от места инъекции клеток. Других четырех лам иммунизировали смесью экспрессирующих векторов с кДНК GARP человека и кДНК TGFβ1 человека, один раз в две недели с четырьмя повторными инъекциями.

Образцы крови объемом 10 мл собирали до и после иммунизации, чтобы исследовать иммунный ответ. Через три-четыре дня после последней иммунизации собирали 400 мл крови для экстракции суммарной РНК из PBL, полученных с использованием градиента Ficoll-Paque и способа, описанного в публикации Chomczynski P., et al., Anal. Biochem. 162: 156-159, 1987. В среднем достигали выходов РНК 450 мкг, которую использовали для синтеза случайной кДНК и ПЦР-амплификации V-областей тяжелой и легкой цепей (Vλ и Vκ) для конструирования фагмидных библиотек, содержащих Fab, как описано De Haard H. с соавт. (J. Biol. Chem. 1999 Jun 25; 274(26): 18218-30), чтобы получить разнообразные библиотеки с высоким уровнем разнообразия ($1\text{-}7\times10^8$).

Иммунный ответ на комплекс GARP-TGFβ1 исследовали в ELISA на нанесенном в виде покрытия растворимом рекомбинантном комплексе GARP-TGFβ1 (1 мкг/мл). Получали пятикратные серийные разведения сыворотки, начиная с 10% сыворотки, и 100 мкл разбавленной сыворотки добавляли лунки с покрытием и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки 3× PBS/твин планшеты блокировали PBS с добавлением 1% казеина (фиг. 8). Связывание обычного IgG1 лам с его мишенью GARP-TGFP измеряли в ELISA, используя мышиное антитело против IgG1 ламы (клон 27E10, Daley L.P., et al. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12, 2005) и конъюгированное с HRP антитело осла протии Ig мыши (Jackson) для регистрации.

Селекция и скрининг GARP-TGFβ1-специфичных Fab.

Фаг, экспрессирующий Fab, получали согласно стандартным протоколам и проводили селекцию на иммобилизованном рекомбинантном растворимом GARP-TGFβ1, используя общее элюирование GARP-TGFβ1-связывающего фага трипсином согласно стандартным протоколам для фагового дисплея.

Осуществляли два-три раунда селекции, чтобы обогатить Fab, специфичные для GARP-TGFβ1 человека, экспрессированные фагом. Контрселекцию по отношению к hGARP и hTGFβ1 (LAP) использовали для обогащения Fab, связывающих комплексы hGARP-TGFβ1. Выделяли отдельные клоны и получали периплазматические фракции (peris) в 96-луночных планшетах при индукции IPTG из всех библиотек согласно стандартным протоколам.

Скрининг hGARP-TGFβ-специфичных Fab осуществляли, используя ELISA. hGARP-TGFβ1 иммобилизовали на планшетах maxisorb. После блокирования 1% казеином в PBS в течение 1 ч давали возможность Fab из 20 мкл периплазматических экстрактов связываться с hGARP-TGFβ1.

Характеристика моноклональных антител.

GARP-TGFβ1/GARP-специфичные клоны секвенировали в областях VH и VL и делили на VH-семейства на основании последовательности CDR3 в VH. Было идентифицировано 17 семейств. Из каждого идентифицированного семейства авторы клонировали по меньшей мере один репрезентативный клон в полностью человеческий IgG1 (LHG1-LHG17). Такие моноклональные антитела анализировали, используя Biacore, в отношении характеристик их связывания с растворимым комплексом человеческого GARP-TGFβ1. Рекомбинантный растворимый человеческий GARP-TGFβ1 иммобилизовали приблизительно по 4000 ед. ответного сигнала на чипе CM5 (GE Healthcare).

Связывание моноклональных антител с комплексом GARP-TGFβ1 человека и макак-крабоедов, экспрессированным на клетках HEK-293, анализировали, используя FACS. Кодирующие последовательности GARP макак-крабоедов и TGFβ1 макак-крабоедов клонировали с образца кДНК из лимфоцитов периферической крови макак-крабоедов (PBMC). Праймеры были основаны на рассчитанных последовательностях GARP макак-крабоедов (XM_005579140.1; SEQ ID NO: 41) и TGFβ1 макак-крабоедов (XM_005589338.1; SEQ ID NO: 42), при этом использовали амплификацию перекрывающихся частей полной последовательности. Как в случае GARP макак-крабоедов, так и в случае TGFβ1 макак-крабоедов анализировали ДНК-последовательности трех отдельных ПЦР-ампликонов. Их полностью выравнивали с рассчитанными последовательностями. GARP макак-крабоедов и TGFβ1 макак-крабоедов клонировали в pCDNA3.1 для временной сверхэкспрессии в клетках HEK293E. Связывание с GARP-TGFβ1 макак-крабоедов сравнивали со связыванием с GARP-TGFβ1 человека, используя FACS. LHG-10 и перетасованные варианты (LHG-10.3 - LHG-10.6) можно считать перекрестно реагирующими с GARP-TGFP1 макак-крабоедов (фиг. 9).

Используемые праймеры:

```
>cyno TGFB S1: cgcctc CCCCATGCCG ccctccg (SEQ ID NO: 43)
>cyno TGFB S2: acaattcctg gcgatacctc (SEQ ID NO: 44)

>cyno TGFB AS1: CTCAACCACTGCCGCACAAC (SEQ ID NO: 45)

>cyno TGFB AS2: TCAGCTGCATTTGCAGGAGC (SEQ ID NO: 46).
```

Перетасовка VK для улучшенной аффинности.

Перетасовку цепи VK использовали для улучшения аффинности мАт LHG-10 (фиг. 10). В данном способе тяжелую цепь исходного клона (VHCH1 LHG-10) снова вводили в фагмидную библиотеку легких цепей. Тяжелую цепь извлекали из экспрессирующего вектора, в котором отсутствует полученный из бактериофага ген 3, необходимый для дисплея, чтобы далее избежать контаминации исходной легкой цепи в ходе селекции. Тяжелую цепь клонировали в фагмидной библиотеке легких цепей и лигированную ДНК использовали для электропорации в клетки E.coli TG1 с целью создания библиотеки перетасованных легких цепей. Размер библиотеки был выше 10^8.

Селекцию в отношении аффинности в сочетании с промывками для диссоциации осуществляли для того, чтобы отобрать Fab с перетасованными цепями с улучшенной аффинностью по отношению к GARP-TGFβ человека. Была выбрана схема, в которой фаги, экспрессирующие Fab, инкубировали с разными концентрациями рекомбинантного растворимого GARP-TGFβ1 человека, который наносили в виде покрытия непосредственно на планшет microsorb.

Добавление рекомбинантного растворимого GARP-TGFβ1 человека в избытке по сравнению с нанесенным в виде покрытия рекомбинантным растворимым GARP-TGFβ1 человека способствовало связыванию фага с более высокой аффинностью. В каждом раунде увеличивали время промывки (табл. 3), чтобы отобрать фаги с лучшей скоростью распада комплекса при отмывании вариантов с более низкой аффинностью. Фаги элюировали трипсином и использовали для инфекции клеток E. coli TG1. В общем, осуществляли 5 раундов селекции. Кроме того, количество вводимого фага уменьшали в последующих раундах, чтобы с одной стороны снизить фон, а с другой стороны уменьшить концентрацию мАт, тем самым повышая жесткость селекции.

Таблица 3

Параметры, варьируемые в случае каждого раунда селекции для перетасовки VK

	RI	RII	RIII	RIV	RV
Концентрации rhGARP-TGFβ	10 мкг/мл 1 мкг/мл 0,1 мкг/мл	10 мкг/мл 1 мкг/мл 0,1 мкг/мл	10 мкг/мл 1 мкг/мл 0,1 мкг/мл	10 мкг/мл 1 мкг/мл 0,1 мкг/мл	10 мкг/мл 1 мкг/мл 0,1 мкг/мл
Объем фага	10 мкл	1 мкл	1 мкл	1 мкл	1 мкл
Время промывки	0 часов	2 часа	O/N	O/3N	O/6N
Условия	–	37°C, 100 мкг/мл rhGARP-TGFβ в 1% казеине	37°C, 100 мкг/мл rhGARP-TGFβ в 1% казеине	37°C, 100 мкг/мл rhGARP-TGFβ в 1% казеине	37°C, 100 мкг/мл rhGARP-TGFβ в 1% казеине

Осуществляли скрининг по меньшей мере 24 клонов из раундов селекции III, IV и V. Клоны выращивали в планшетах с глубокими лунками (экспрессия 1 мл) и получали периплазматические фракции. Такие периплазматические экстракты анализировали, используя Biacore, в отношении улучшенных скоростей распада комплексов. Четыре наилучших клона Fab с улучшенными скоростями распада комплексов клонировали с получением hIgG1 (серии LHG-10), а также потерявшего эффекторную функцию варианта hIgG1 с заменой N297Q в Fc-области (серии LHG-10-D), и полученные в результате IgG анализировали в отношении улучшенных характеристик связывания, используя Biacore (табл. 4). Кроме того, IgG LHG-10-D проверяли в отношении перекрестной реактивности с GARP макак-крабоедов/TGF-β1 макак-крабоедов в основанном на FACS анализе, используя клетки HEK-293E, трансфицированные GARP макак-крабоедов/TGFβ макак-крабоедов или GARP человека/TGFβ человека. MHGARP8 также тестировали в таком анализе перекрестной реактивности. Все LHG-10-D и MHG-8 перекрестно взаимодействовали против GARP макак-крабоедов/TGFβ макак-крабоедов (фиг. 9).

Таблица 4

Характеристики связывания перетасованных клонов

		ассоциация		диссоциация		аффинность	
		ka (1/M сек)	Кратное улучшение	kd (1/сек)	кратное улучшение	KD	Кратное улучше-ние
mIgG1	MHGARP8	1,25E+05	N/A	3,39E-05	N/A	2,64E-10	N/A
hIgG1-N297Q	LHG-10-D	1,42E+05	1,0	2,62E-05	1,0	1,85E-10	1,0
	LHG-10.3-D	2,31E+05	0,6	5,18E-06	5,1	2,24E-11	8,3
	LHG-10.4-D	3,71E+05	0,4	1,21E-05	2,2	3,27E-11	5,7
	LHG-10.5-D	3,83E+05	0,4	1,07E-05	2,4	2,80E-11	6,6
	LHG-10.6-D	2,84E+05	0,5	6,15E-06	4,3	2,16E-11	8,6
hIgG1	LHG-10	2,39E+05	1,0	3,12E-05	1,0	1,31E-10	1,0
	LHG-10.3	2,87E+05	0,8	6,38E-06	4,9	2,22E-11	5,9
	LHG-10.4	4,48E+05	0,5	1,30E-05	2,4	2,91E-11	4,5
	LHG-10.5	4,15E+05	0,6	1,37E-05	2,3	3,31E-11	4,0
	LHG-10.6	2,76E+05	0,9	4,40E-06	7,1	1,59E-11	8,2

Пример 6. Два анти-hGARP-мАт (MHGARP8 и LHG-10) ингибируют продукцию активного TGF-β1 в Treg человека.

Стимулированные Treg человека продуцируют активный TGF-β1 вблизи своей клеточной поверхности. Аутокринная и паракринная активность TGF-β1 индуцирует фосфорилирование SMAD2 в самих Treg и в Th-клетках, культивируемых совместно с Treg (Stockis, J. et al. Eur. J. Immunol. 2009, 39: 869-882). Чтобы проверить, требуется ли GARP для активации TGF-β1 клетками Treg, авторы стимулировали Treg человека в присутствии или в отсутствие анти-hGARP-мАт и измеряли фосфорилирование SMAD2, используя Вестерн-блот. В качестве источника Treg человека авторы использовали клетки $CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{lo}$, отсортированные из PBMC и размноженные in vitro в течение 12-14 дней (Gauthy E. et al. PLoS One. 2013 Sep 30; 8(9): e76186). Как определено с использованием метилспецифичной кПЦР, популяции размноженных клеток содержат от 44 до 82% клеток с деметилированным аллелем FOXP3i1, что свидетельствует о том, что они все еще в высокой степени обогащены Treg.

Как и ожидалось, фосфорилированный SMAD2 выявляли в стимулированных Treg и не выявляли в нестимулированных Treg и в Treg, стимулированных в присутствии нейтрализующего анти-TGF-β1-антитела (фиг. 11). Количество фосфорилированного SMAD2 было сильно снижено в Treg, стимулированных в присутствии MHGARP8 (обозначенного MHG-8 на фиг. 11A) или LHG-10 (фиг. 11B), что свидетельствует о том, что указанные два анти-hGARP-мАт блокируют продукцию активного TGF-β. 29 других новых анти-hGARP-мАт, а также 4 коммерчески доступных анти-hGARP-мАт не блокируют продукцию TGF-β клетками Treg (фиг. 11).

Ингибирующая активность MHGARP8 и LHG-10 показывает, что GARP необходим для продукции активного TGF-β1 клетками Treg человека.

Пример 7. MHGARP8 и LHG-10 ингибируют супрессорную активность Treg человека in vitro.

Ранее авторы показали, что Treg человека супрессируют другие Т-клетки, по меньшей мере отчасти, за счет продукции активного TGF-β1 (Stockis, J. et al. Eur. J. Immunol. 2009, 39: 869-882). Поэтому авторы проверяли, ингибируют ли MHGARP8 (MHG-8) и LHG-10 также и функцию Treg человека в анализах супрессии in vitro. Авторы использовали клон Treg в качестве источника Treg, и свежевыделенные клетки $CD4^{+}CD25^{-}CD127^{hi}$ или клон Т-клеток $CD4^{+}$ (Th-клетки) в качестве мишеней для супрессии. Treg и Th-клетки стимулировали >CD3 и >CD28 в присутствии или в отсутствие различных дополнительных мАт. Как показано на фиг. 12, клон Treg A1 ингибировал пролиферацию Th-клеток $CD4^{+}CD25^{-}CD127^{hi}$ на 66% в отсутствие анти-hGARP-мАт. Супрессия была снижена до 36% и 32% в присутствии MHG-8 или LHG-10 соответственно, но не была снижена в присутствии 6 других анти-hGARP-мАт. Авторы также измеряли супрессию клоном Treg A1 другой Th-мишени (клон Th A2) в присутствии MHGARP8, анти-hTGF-β1-мАт или изотипического контроля. MHGARP8 (MHG-8) ингибировало супрессорную активность Treg A1 in vitro подобно ингибированию анти-TGF-β1-антителом, тогда как изотипический контроль не оказывал влияния (фиг. 12).

Пример 8. Эпитопы, узнаваемые ингибирующими анти-hGARP-мАт.

Только небольшая часть (2/35) анти-hGARP-мАт блокирует продукцию активного TGF-β и супрессию клетками Treg. Такое явление может быть следствием их способности связывать эпитоп (эпитопы), которые отличаются от эпитопов, связываемых не ингибирующими мАт. Поэтому авторы картировали области, необходимые для связывания ингибирующими и не ингибирующими мАт.

GARP ассоциирует с про- или латентным TGF-β1 с образованием связанных дисульфидами комплексов GARP/TGF-β1 (фиг. 13 и Stockis 2009b Eur. J. Immunol. 2009. 39: 3315-3322 и Gauthy E. et al.).

Сначала авторы попытались определить, связывают ли анти-hGARP-мАт также и комплексы GARP/TGF-β1, используя эксперименты по коиммунопреципитации (IP) в мышиных клетках BW, трансфицированных hGARP и hTGFB1. Авторы тестировали 32 анти-hGARP-мАт: полученные авторами 31 новое мАт и коммерчески доступное мАт Plato-1. Все мАт эффективно иммунопреципитировали GARP (верхняя панель на фиг. 14A, показывающая IP с использованием 12 репрезентативных мАт). Pro-TGF-β1, а также LAP и зрелый TGF-β1 (т.е. латентный TGF-β1) подвергались коимунопреципитации под действием 24 мАт, что свидетельствует о том, что они связывают комплексы GARP/TGF-β1 (6 мАт показаны на фиг. 14A, средняя и нижняя панели). Напротив, 8 мАт (3 показаны на фиг. 14A) не коиммунопреципитировали про- или латентный TGF-β1, что свидетельствует о том, что они связывают свободный GARP, а не комплексы GARP/TGF-β1.

Авторы подтвердили полученные данные в FACS-анализах трансфицированных клеток 293T (фиг. 14B). Нетрансфицированные клетки 293T не экспрессируют GARP и экспрессируют очень низкие уровни эндогенного TGF-β1. Не выявлено латентного TGF-β на их поверхности с использованием анти-LAP-антитела. Трансфекция GARP или TGFB1 по отдельности не индуцирует или индуцирует низкий уровень поверхностного LAP, соответственно, тогда как котрансфекция GARP и TGFB1 индуцирует высокий уровень поверхностного LAP в результате связывания и презентации латентного TGF-β1 белком GARP (фиг. 14B, левые гистограммы).

Три группы анти-hGARP-мАт выявлены в результате анализа трансфицированных клеток 293T и классифицированы, как показано в 3 колонках на фиг. 13B. Первая группа (левая колонка) включает 8 мАт, которые не коиммунопреципитируют про- или латентный TGF-β1: они связывают клетки 293T, трансфицированные только отдельным hGARP, но не hGARP и hTGFB1. Полученные данные подтверждают, что такие мАт связывают только свободный GARP, так как связывание с поверхностным GARP утрачивается в присутствии TGF-β1 (на фиг. 14B показаны 3 репрезентативных мАт из такой группы). Вторая группа включает большинство других мАт (19 мАт, средняя колонка на фиг. 13B): они связывают клетки 293T одинаково хорошо при трансфекции hGARP отдельно или hGARP и hTGFB1, что свидетельствует о том, что они связывают как свободный GARP, так и комплексы GARP/TGF-β1 (на фиг. 14B показано 6 мАт из такой группы). Интересно, что третья группа из 5 мАт связывает клетки 293T, трансфицированные hGARP и hTGFB1, но не связывает клетки, трансфицированные только hGARP (правая колонка на фиг. 13B). Такие мАт связывают комплексы GARP/TGF-β1, но не связывают свободный GARP и включают ингибирующие антитела MHGARP8 (MHG-8) и LHG-10 (на фиг. 14B показано 3 мАт из такой группы).

На основании вышесказанного авторы пришли к заключению, что большинство мАт связывают свободный только GARP (8/32) или свободный GARP и комплексы GARP/TF-β1 (19/32). Только 5 мАт, включая ингибирующие MHGARP8 (MHG-8) и LHG-10, а также 3 не ингибирующих мАт, связывают комплексы GARP/TGF-β1, но не связывают свободный GARP. Такая картина узнавания не объясняет, почему только MHGARP8 и LHG-10 являются ингибирующими.

Затем авторы попытались определить области hGARP, необходимые для связывания различными мАт. Большинство анти-hGARP-мАт не взаимодействуют перекрестно с мышиным GARP (mGARP). Авторы сконструировали плазмиды, кодирующие HA-меченные химеры mGARP/hGARP (фиг. 15A, левая панель) и трансфицировали ими клетки 293T с или без hTFGB1 в зависимости от требований связывания, определенных выше. Все химеры экспрессировались на сходных уровнях на поверхности клеток 293T, как показано по окрашиванию анти-HA-мАт (фиг. 15A, гистограммы справа). Картины связывания с химерами mGARP/hGARP (фиг. 15A, 10 репрезентативных мАт) позволили идентифицировать область hGARP, необходимую для связывания каждым из анти-hGARP-мАт. Данные суммированы на фиг. 15B, где мАт распределены рядами, соответствующими разным областям hGARP: мАт в первом ряду требуют области, содержащей аминокислоты 20-101 ($hGARP_{20-101}$), мАт во втором ряду требуют $hGARP_{101-141}$, антитела в третьем ряду требуют $hGARP_{141-207}$, в четвертом $hGARP_{265-332}$ и, наконец, пятая группа требует $hGARP_{332-628}$. Однако даже с учетом областей, необходимых для связывания, эпитоп, узнаваемый ингибирующими MHGARP8 (обозначено MHG-8 на фиг.) и LHG-10 невозможно отличить от эпитопа, узнаваемого не ингибирующими мАт: MHGARP8 и LHG-10, подобно LHG-3, -12 и -13, связывают комплексы GARP/TGF-β, которые содержат $hGARP_{101-141}$.

Последовательности мышиного и человеческого $GARP_{101-141}$ отличаются по аминокислота в 14 положениях, включая 3 кластера из 3 следующих друг за другом положений (фиг. 15B, левая панель). Авторы сконструировали 3 мутантных варианта hGARP. В каждом мутанте серию из 3 следующих друг за другом аминокислот из области 101-141 заменяли аминокислотами, встречающимися в mGARP. Авторы трансфицировали клетки 293T HA-мечеными мутантами, отдельно или вместе с hTGFB1, в зависимости от требований к связыванию тестированными мАт. Картины связывания с мутантами показали 3 типа мАт (фиг. 15B, правая панель), которые требуют аминокислот $hGARP_{111-113}$, $hGARP_{126-127}$ или $hGARP_{137-139}$ для связывания соответственно. Шесть мАт, включая MHGARP8 (обозначенное MHG-8 на фигуре) и LHG-10, требовали $hGARP_{137-139}$ (фиг. 13B). В то время как 4 из 6 могли связывать свободный hGARP, MHG-8 и LHG-10 являются единственными мАт, которые требуют $hGARP_{137-139}$ в контексте

комплексов GARP/TGF-β1.

На основании приведенных выше данных авторы пришли к заключению, что ингибирование продукции TGF-β антителами MHGARP8 и LHG-10 ассоциировано со способностью связывать эпитоп, который отличается от эпитопов, узнаваемых всеми другими не ингибирующими анти-hGARP-мАт.

Пример 9. Ингибирование функции Treg человека анти-hGARP-антителами in vivo.

Затем авторы попытались оценить, могут ли ингибирующие анти-hGARP-мАт ингибировать функцию Treg человека in vivo. Авторы использовали модель болезни ксеногенный трансплантат против хозяина (GVHD), индуцированной переносом мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека мышам с иммунной недостаточностью NOD/Scid/IL2Rg$^{-/-}$ (NSG). Мыши NSG имеют нарушенную передачу сигнала цитокинов и не имеют функциональных Т-, В- и NK-клеток, что позволяет очень эффективно осуществлять трансплантацию Т-клеток человека посредством внутривенной инъекции PBMC. Через тридцать-сорок дней после переноса PBMC у реципиентных мышей развивалась ксеногенная GVHD вследствие активности цитотоксических Т-лимфоцитов человека против мышиных тканей Shultz, Nat. Rev. Immunol. 2012 Nov; 12(11): 786-98. В такой модели совместный перенос Treg человека с PBMC человека приводит к ослаблению GVHD (Hannon et al. Transfusion. 2014 Feb; 54(2): 353-63), обеспечивая модель для тестирования ингибирующей активности анти-hGARP-мАт по отношению к Treg человека in vivo.

Авторы переносили PBMC человека (3×10^6/мышь) вместе или без аутологичных Treg ($1{,}5\times10^6$/мышь) мышам NSG (фиг. 16A). В качестве источника Treg человека авторы использовали клетки крови $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}$, которые было кратковременно размножены in vitro, как описано выше. Кроме того, мышам инъецировали MHGARP8 (обозначенное на фиг. MHG-8), анти-TGF-β1, изотипический контроль или PBS за день до трансплантации и затем еженедельно. Объективные показатели GVHD контролировали раз в две недели, чтобы получить оценку заболевания на основании потери массы, пониженной активности, анемии или желтухи и потери шерсти. Авторы провели четыре независимых эксперимента (фиг. 16B), а подробные результаты показаны для одного эксперимента (фиг. 16C). В зависимости от эксперимента появление заболевания (средняя оценка GVHD ≥1) наблюдали на 28-41 день после переноса PBMC в группах мышей, которые не получали мАт или в случае изотипического контроля. Совместный перенос Treg задерживал появление заболевания, которое наступало через 46-72 дня после переноса, что свидетельствует о том, что Treg человека способны супрессировать ответы Т-клеток человека, направленные против ксеногенных антигенов. Введение MHGARP8 мышам, которым переносили PBMC и Treg, отменяло защитное действие Treg: заболевание наступало также рано, как в случае мышей, получавших только PBMC (через 28-44 дня после переноса). Ингибирование супрессорной функции Treg антителом MHGARP8 сходно с ингибированием, наблюдаемым в случае нейтрализующего анти-TGF-β1-антитела. Изотипический контроль не оказывал влияния.

Полученные данные, вместе взятые, показывают, что MHGARP8 ингибирует иммуносупрессорную функцию Treg человека in vivo.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула антитела, связывающаяся с эпитопом комплекса преобладающих повторов гликопротеида A (hGARP) человека и латентного TGF-β1, причем эпитоп содержит остатки Y137, S138 и G139 hGARP аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и причем молекула антитела содержит

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

VH-CDR1: SYYID (SEQ ID NO: 13);

VH-CDR2: RIDPEDGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 14) или любую CDR, имеющую аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 14;

VH-CDR3: NEWETVVVGDLMYEYEY (SEQ ID NO: 15) или любую CDR, имеющую аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 15, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую следующие CDR:

VL-CDR1: QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 31);

VL-CDR2: GASRLKT (SEQ ID NO: 32);

VL-CDR3: QQYASVPVT (SEQ ID NO: 33).

2. Молекула антитела по п.1, ингибирующая передачу сигнала TGF-β1.

3. Молекула антитела по любому из пп.1 или 2, причем молекула антитела связывается с конформационным эпитопом, содержащим эпитоп hGARP, модифицированным в результате того, что hGARP находится в комплексе с латентным TGF-β1.

4. Молекула антитела по любому из пп.1 или 2, причем молекула антитела связывается со смешанным эпитопом, содержащим аминокислоты hGARP и аминокислоты латентного TGF-β1.

5. Молекула антитела по любому из пп.1-4, причем молекула антитела представляет собой гуманизированное антитело.

6. Молекула антитела по любому из пп.1-5, в которой аминокислотной последовательностью вариабельной области тяжелой цепи является SEQ ID NO: 34 или любая последовательность, которая по

меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 34, и аминокислотной последовательностью вариабельной области легкой цепи является SEQ ID NO: 39.

7. Антитело MHGARP8 или его антигенсвязывающий фрагмент, продуцируемый гибридомой LMBP 10246CB.

8. Линия клеток гибридомы, продуцирующих антитело к hGARP по п.7.

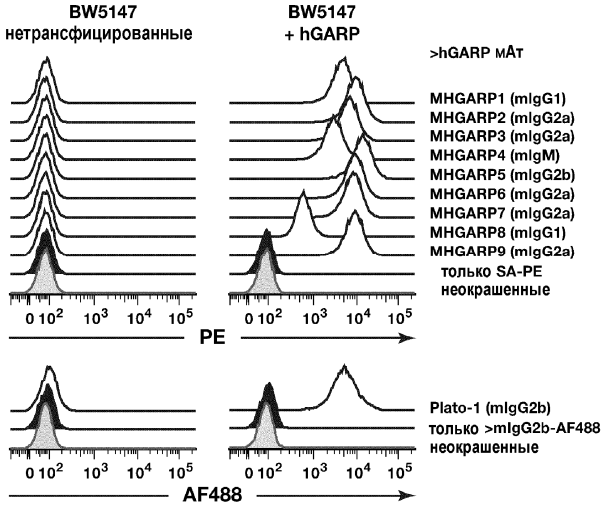
9. Фармацевтическая композиция для ингибирования активности TGF-β у пациента, содержащая молекулу антитела по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

10. Фармацевтическая композиция для лечения связанного с TGF-β расстройства у пациента, содержащая молекулу антитела по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

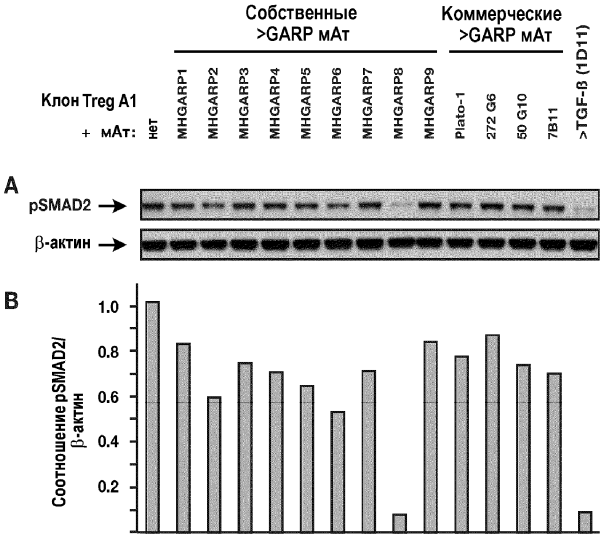
11. Применение фармацевтической композиции по п.9 или 10 в качестве иммуностимулирующего средства для лечения пациентов со злокачественными опухолями.

12. Способ ингибирования активности TGF-β у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества антитела по любому из пп.1-6.

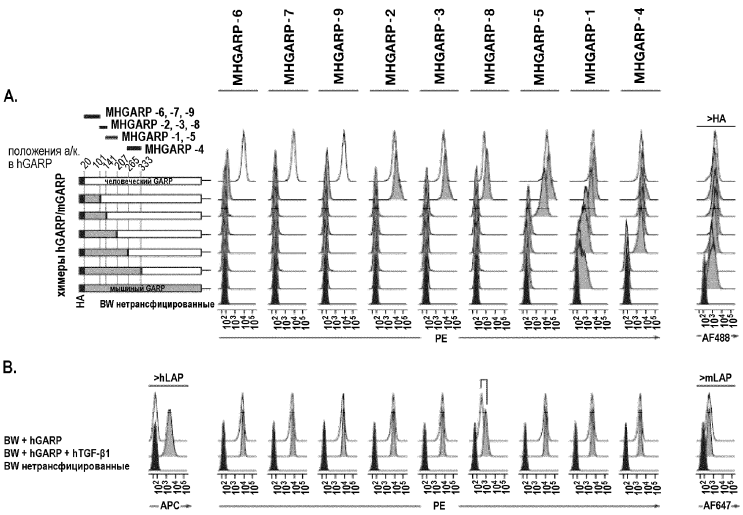
13. Способ лечения связанного с TGF-β расстройства у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества антитела по любому из пп.1-6.



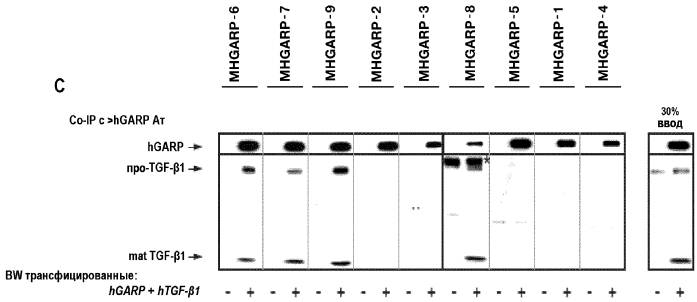
Фиг. 1



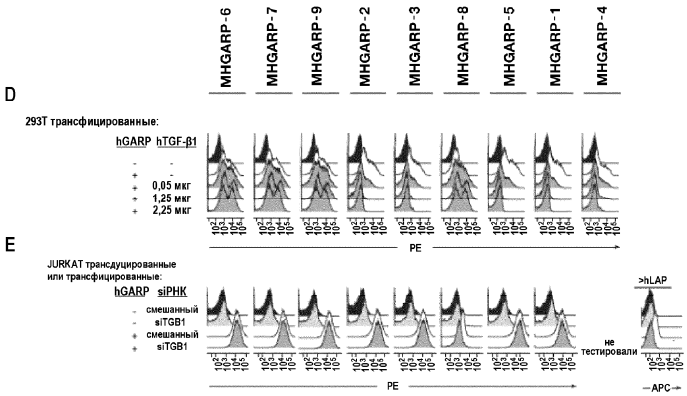
Фиг. 2



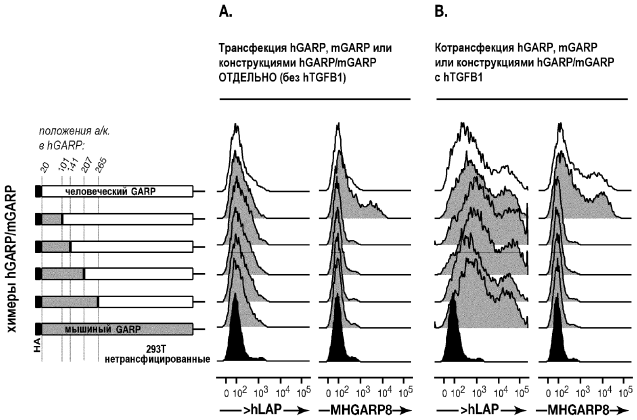
Фиг. 3A-B



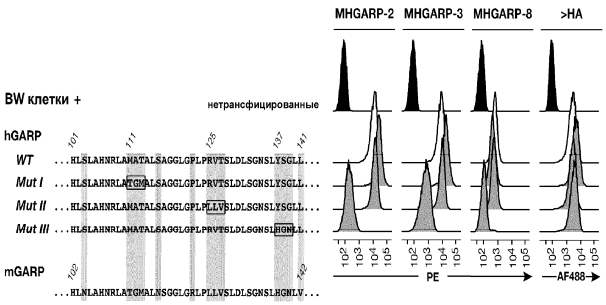
Фиг. 3C



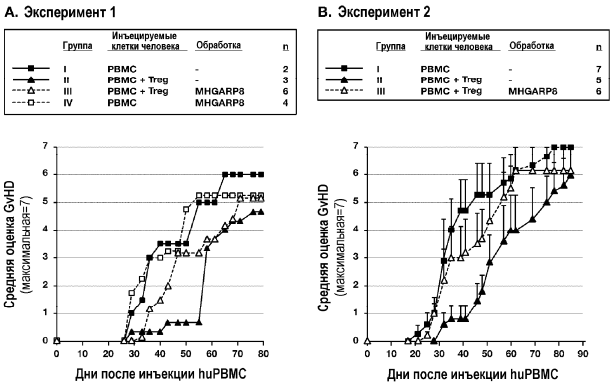
Фиг. 3D-E



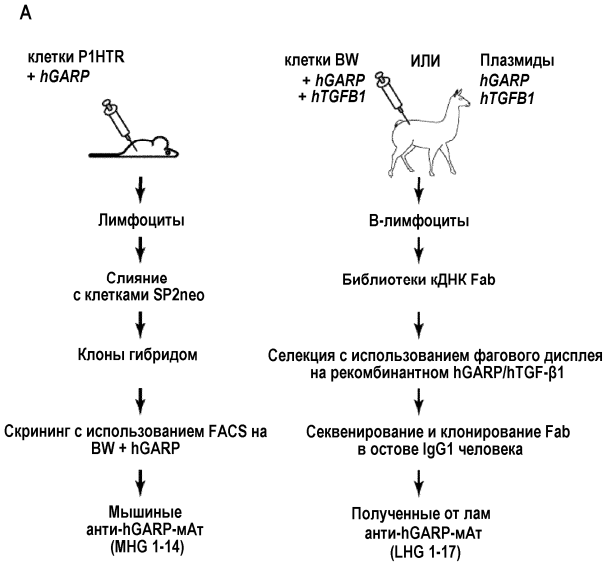
Фиг. 4



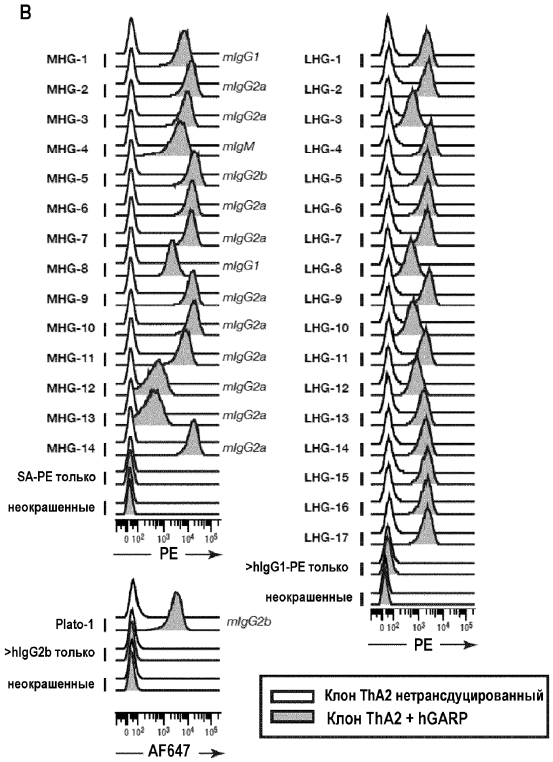
Фиг. 5



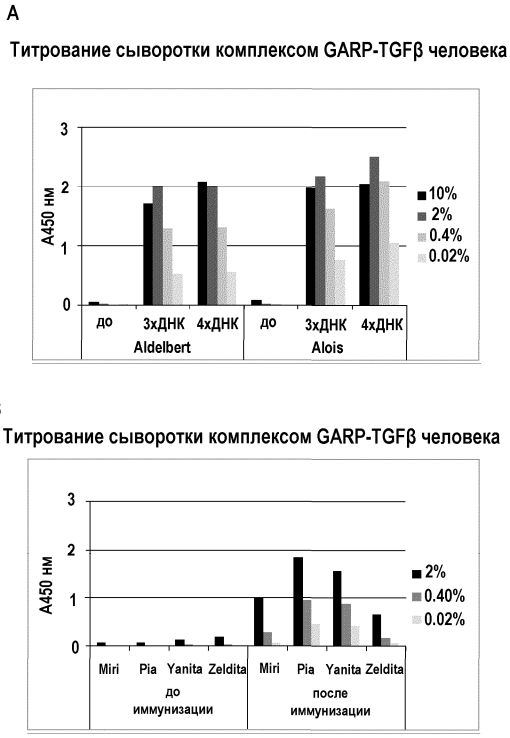
Фиг. 6



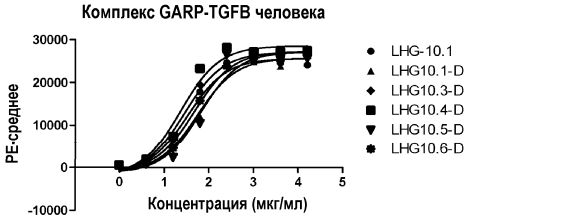
Фиг. 7A

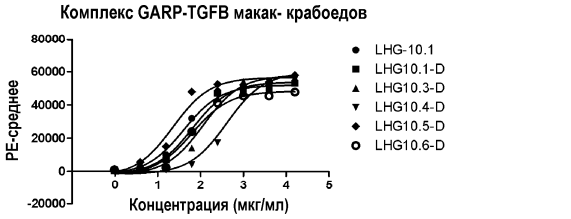

B
MHG-1
MHG-2
MHG-3
MHG-4
MHG-5
MHG-6
MHG-7
MHG-8
MHG-9
MHG-10
MHG-11
MHG-12
MHG-13
MHG-14
SA-PE только
неокрашенные
mIgG1
mIgG2a
mIgM
mIgG2b
PE
LHG-1
LHG-2
LHG-3
LHG-4
LHG-5
LHG-6
LHG-7
LHG-8
LHG-9
LHG-10
LHG-11
LHG-12
LHG-13
LHG-14
LHG-15
LHG-16
LHG-17
>hIgG1-PE только
неокрашенные
Plato-1
>hIgG2b только
неокрашенные
mIgG2b
AF647
Клон ThA2 нетрансдуцированный
Клон ThA2 + hGARP

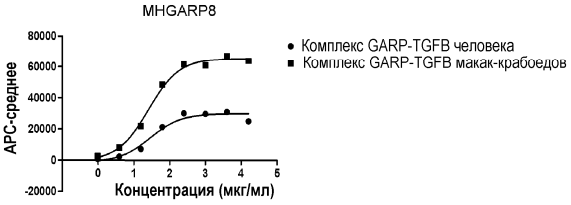
Фиг. 7B


A
Титрование сыворотки комплексом GARP-TGFβ человека
A450 нм
10%
2%
0.4%
0.02%
до
3хДНК
4хДНК
Aldelbert
Alois
B
Титрование сыворотки комплексом GARP-TGFβ человека
A450 нм
2%
0.40%
0.02%
Miri
Pia
Yanita
Zeldita
до иммунизации
после иммунизации

Фиг. 8







Фиг. 9

последовательности VH LHG10

```
                                   CDR1                    CDR2                                                    CDR3
LHG-10   EVQLVQPGAELRKSGASVKVSCKASGYRFT SYYID WVRQAPGQGLEHMG RIDPEDGGTKYAQKFQG RVTFTADTSTSTAYVELSSLRSEDTAVYYCAR NEWETVVVGDLMYEYEY WGQGTQVTVSS
```

последовательности VL LHG10

```
                                   CDR1                    CDR2                                                    CDR3
LHG10    DIQMTQSPTSLSASLGDRVTITC QASQSISSYLA WYQQKPGQAPKLLIY GASRLQT GVPSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYYC QQYDSLPVT FGQGTKVELK
```

последовательности VK оптимизированных по аффинности перетасованных вариантов LHG-10

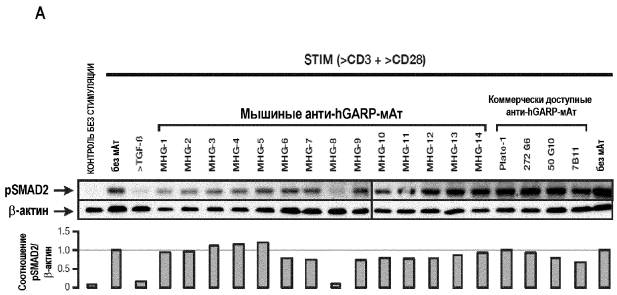
```
                                   CDR1                    CDR2                                                    CDR3
LHG10    DIQMTQSPTSLSASLGDRVTITC QASQSISSYLA WYQQKPGQAPKLLIY GASRLQT GVPSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYYC QQYDSLPVT FGQGTKVELK
LHG10.4  DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITC QASQSISSYLA WYQQKPGQAPKLLIY GTSRLKT GVPSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYYC QQYYSAPVT FGQGTKVELK
LHG10.6  DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITC QASQSISSYLA WYQQKPGQAPNILIY GASRLKT GVPSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYYC QQYASVPVT FGQGTKVELK
LHG10.3  DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITC QASQSIVSYLA WYQQKPGQAPKLLIY GASRLQT GVPSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYYC QQYASAPVT FGQGTGVELK
LHG10.5  DIQMTQSPSSLSPSLGDRVTITC QASQTISSFLA WYHQKPGQPPKLLIY RASIPQT GVPSRFSGSGSGTSFTLTIGGLEAEDAGTYYC QQYVSAPPT FGQGTKVELK

LHG10    DIQMTQSPTSLSASLGDRVTITC QASQSISSYLA WYQQKPGQAPKLLIY GASRLQT GVPSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYYC QQYDSLPVT FGQGTKVELK
LHG10.4  ........S............. .......... ................ .T...K. ............................... ...Y.A... ..........
LHG10.6  ........S............. .......... .........NI... .....K. ............................... ...A.V... ..........
LHG10.3  ........S............. ......V.... ................ ....... ............................... ...A.A... .....G....
LHG10.5  ........S...P......... ....T...F.. ..H.....P...... R..IP.. ....................G.......... ...V.A.P. ..........
```

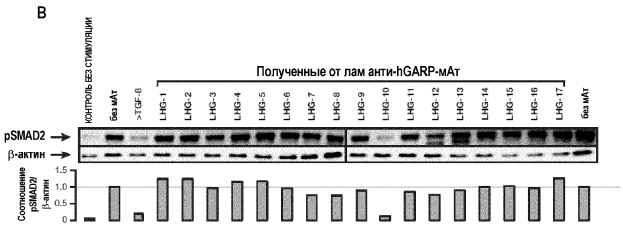
Таблица X: последовательности CDR LHG-10 (VH и VK), а также последовательности оптимизированных по аффинности вариантов VK

мАт	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
LHG-10 VH	SYYID		RIDPEDGGTKYAQKFQG		NEWETVVVGDLMYEYEY	
LHG10 VK	QASQSISSYLA		GASRLQT		QQYDSLPVT	
LHG10.3 VK	QASQSIVSYLA		GASRLQT		QQYASAPVT	
LHG10.4 VK	QASQSISSYLA		GTSRLKT		QQYYSAPVT	
LHG10.5 VK	QASQTISSFLA		RASIPQT		QQYVSAPPT	
LHG10.6 VK	QASQSISSYLA		GASRLKT		QQYASVPVT	

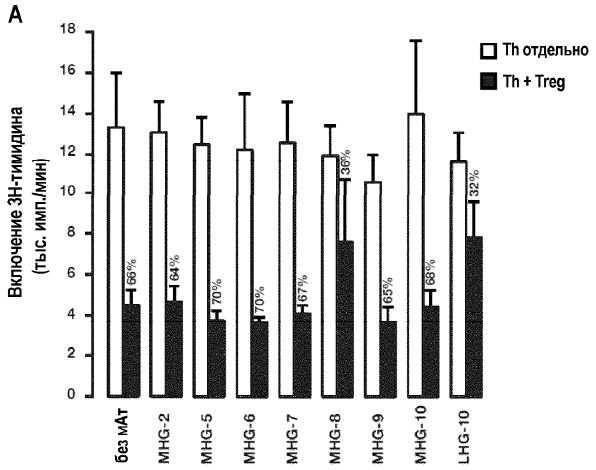
Фиг. 10

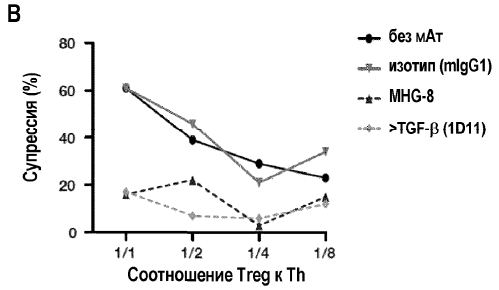


Фиг. 11A

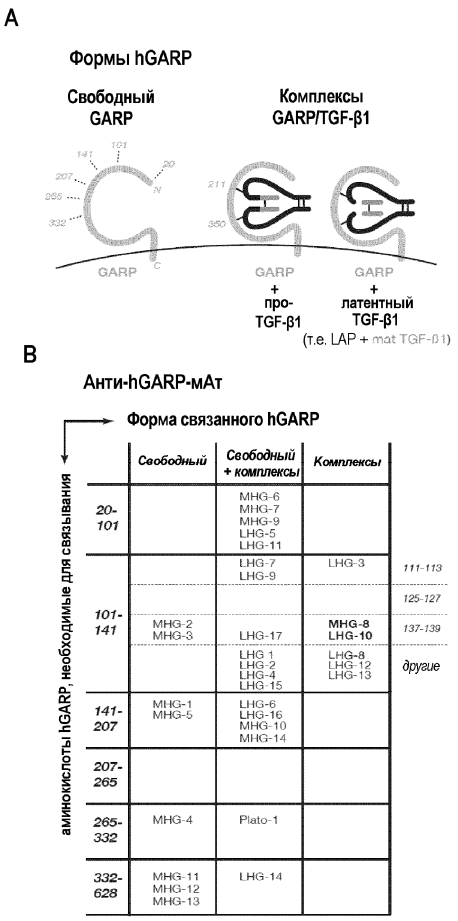


Фиг. 11B

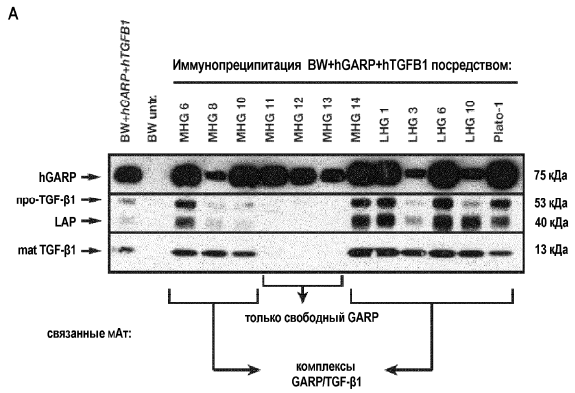




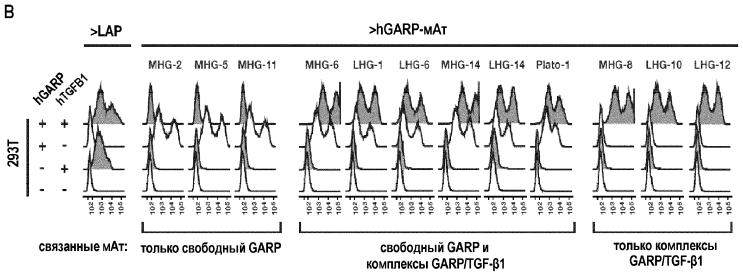
Фиг. 12



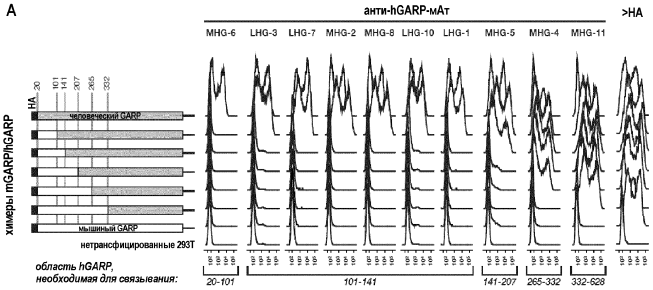
Фиг. 13



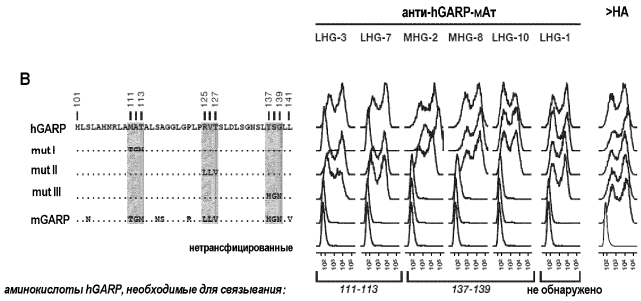
Фиг. 14A



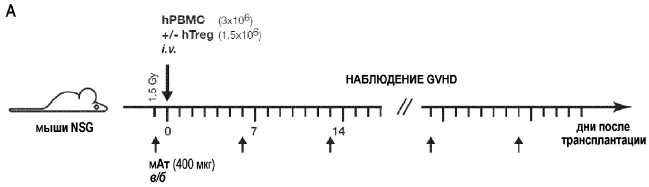
Фиг. 14B



Фиг. 15A



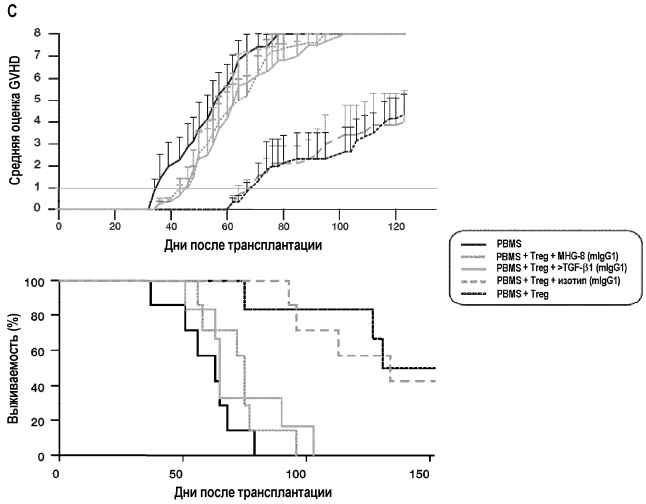
Фиг. 15B



B

Эксперимент	Донор	Дни появления заболевания средняя оценка ≥1					
		PBMC		PBMC + Treg		PBMC + Treg + MHG-8	
		a		b		c	
I	A	29	(n=2)	58	(n=3)	36	(n=6)
II	B	28	(n=7)	46	(n=5)	28	(n=6)
III	B	41	(n=8)	57	(n=5)	41	(n=6)
IV	C	37	(n=8)	72	(n=7)	44	(n=8)

Фиг. 16A-B



Фиг. 16C