

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202192400 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.01.25

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.04.08

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ ИНТЕГРИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/830,961

(72) Изобретатель:

(32) 2019.04.08

Графф Кристилин, Палмер Кристина,  
Блэйкли Бретт, Маллен Трэиси,  
Гардет Агнес (US)

(33) US

(86) PCT/US2020/027271

(87) WO 2020/210358 2020.10.15

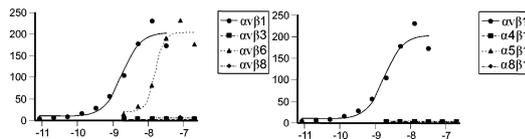
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

БИОГЕН МА ИНК. (US)

Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,  
Прищепный С.В., Гизатуллина Е.М.,  
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,  
Гизатуллин Ш.Ф., Парамонова К.В.  
(RU)

(57) Описаны антитела против интегрина. Также описаны способы применения указанных антител для лечения или профилактики нарушений, таких как фиброзирующие заболевания, онкологические заболевания, офтальмологические заболевания и НАЖБП. Дополнительно описаны способы отбора антитела, которое специфически связывается с  $\alpha\nu\beta 1$ , или которое связывается с  $\alpha\nu\beta 1$  и  $\alpha\nu\beta 6$ , или которое связывается с одним или большим числом представителей подсемейства RGD-связывающих интегринов.



A1

202192400

202192400

A1

Антитела против интегрина и их применение**ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ**

Данная заявка испрашивает приоритет относительно предварительной заявки на патент США № 62/830961, поданной 8 апреля 2019 г., содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей ее полноте.

**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Данное изобретение в целом относится к антителам против интегрина (например, антителам, которые связываются с одним или большим числом представителей подсемейства RGD-связывающих интегринов), и их применению.

**УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Интегрины представляют собой рецепторы клеточной адгезии, которые играют важную роль в процессах развития и в патологических процессах. Интегрины экспрессируются широко, и каждая имеющая ядро клетка в организме имеет специфический интегриновый паттерн. Данные рецепторы состоят из нековалентно связанных альфа- ( $\alpha$ ) и бета- ( $\beta$ ) цепей, которые в комбинации дают различные гетеродимерные белки с отличительными клеточными и адгезивными особенностями. Семейство интегринов состоит из 24 гетеродимерных  $\alpha\beta$ -представителей, которые опосредуют прикрепление клеток к внеклеточному матриксу (ВКМ), но также принимают участие в специализированных межклеточных взаимодействиях.  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы не имеют гомологии друг с другом, но разные  $\alpha$ -субъединицы имеют сходства между собой, и в разных  $\beta$ -субъединицах интегрин имеют консервативные области. Подмножество интегринов (8 из 24) распознает последовательность RGD (аргинин (R), глицин (G) и аспарагиновая кислота (D)) в нативных лигандах, и данные интегрины также называют RGD-связывающими интегринными, которые включают в себя интегрины  $\alpha\nu\beta1$ ,  $\alpha\nu\beta3$ ,  $\alpha\nu\beta5$ ,  $\alpha\nu\beta6$ ,  $\alpha\nu\beta8$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha8\beta1$  и  $\alpha11\beta3$ . Интегрины участвуют в регуляции множества клеточных процессов, включая клеточную адгезию, миграцию, инвазию, дифференциацию, пролиферацию, апоптоз и экспрессию генов. Соответственно, существует необходимость в разработке антител против интегрин, которые полезны при лечении заболеваний, связанных с интегриновым путем, таких как фиброзирующие заболевания, офтальмологические заболевания и рак.

**КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В одном аспекте в данном изобретении представлено антитело, которое специфически связывается с интегрином  $\alpha\nu\beta1$ , но не с другими интегринными. В некоторых вариантах осуществления указанные антитела не связывают другие  $\alpha\nu$ - или  $\beta1$ -содержащие гетеродимеры интегрин. В некоторых вариантах осуществления антитела против  $\alpha\nu\beta1$  не связывают другие RGD-интегрины (например, интегрины  $\alpha\nu\beta3$ ,  $\alpha\nu\beta5$ ,  $\alpha\nu\beta6$ ,  $\alpha\nu\beta8$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha8\beta1$  и  $\alpha11\beta3$ ). В некоторых вариантах осуществления указанное антитело конкурирует с и/или связывает тот же эпитоп, что и референсное антитело против интегрин  $\alpha\nu\beta1$ , содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VH и VL указанного референсного антитела содержат: (i) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12, соответственно; (ii) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, соответственно; (iii) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:27, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:28, соответственно; (iv) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:30, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:12, соответственно; (v) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, соответственно; (vi) аминокислотную

последовательность, указанную в SEQ ID NO:44, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:45, соответственно; (vii) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:49, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:50, соответственно; (viii) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:57, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:58, соответственно; (ix) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:58, соответственно; или (x) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:64, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:58, соответственно.

В другом аспекте в данном изобретении представлено антитело, которое специфически связывается как с интегрином  $\alpha\beta 1$ , так и с интегрином  $\alpha\beta 6$ , но не с другими интегринными. В некоторых вариантах осуществления указанные антитела не связывают другие  $\alpha$ -,  $\beta 1$ - или  $\beta 6$ -содержащие гетеродимеры интегрин. В некоторых случаях указанное антитело не связывает другие RGD-связывающие интегрины (например, интегрины  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 11\beta 3$ ), кроме интегринов  $\alpha\beta 1$  и  $\alpha\beta 6$ . В некоторых вариантах осуществления указанное антитело конкурирует с и/или связывает тот же эпитоп, что и референсное антитело, которое связывает как интегрин  $\alpha\beta 1$ , так и интегрин  $\alpha\beta 6$ , и содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VH и VL указанного референсного антитела содержат: (i) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:44, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:68, соответственно; (ii) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:44, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:70, соответственно; (iii) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:49, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:72, соответственно; или (iv) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:76, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:77, соответственно.

В другом аспекте в данном изобретении представлено антитело, которое специфически связывается с интегрином  $\alpha\beta 1$  и еще с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 11\beta 3$ . В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывает  $\alpha\beta 1$  и  $\alpha\beta 8$ . В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывает  $\alpha\beta 1$  и  $\alpha\beta 3$ . В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывает  $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$  и  $\alpha\beta 8$ . В некоторых вариантах осуществления указанные антитела не связываются с интегринными, кроме одного или большего числа RGD-связывающих интегринов. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело конкурирует с и/или связывает тот же эпитоп, что и референсное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VH и VL указанного референсного антитела содержат: (i) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:82, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:83, соответственно; (ii) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:92, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:93, соответственно; (iii) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:92, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:95, соответственно; (iv) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:100, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:28, соответственно; (v) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:104, соответственно; или (vi) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:49, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ

ID NO:107, соответственно.

В другом аспекте в данном изобретении представлено антитело, которое специфически связывается с  $\alpha\beta 1$  человека и имеет одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4 или 5) из следующих свойств: (i) связывается с высокой аффинностью, характеризующейся показателем константы диссоциации ( $KD$ )  $\leq 20$  нМ (бивалентная аффинность), с  $\alpha\beta 1$  человека; (ii) блокирует взаимодействие  $\alpha\beta 1$  с его лигандом (например, с ассоциированным с латентностью пептидом (LAP) и фибронектином); (iii) является зависимым от катионов (например, кальция и магния; или марганца) или не зависимым от катионов для связывания с  $\alpha\beta 1$  человека; (iv) связывается с  $\alpha\beta 1$  на фибробластах; и (v) ингибирует ответ фибробластов на трансформирующий фактор роста бета (TGF $\beta$ ) (например, как оценивается в анализе на ингибитор активатора плазминогена 1 (PAI-1), индуцированный лизофосфатидной кислотой (LPA)). В некоторых вариантах осуществления указанное антитело является интернализированным. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с  $\alpha\beta 1$  яванской макаки,  $\alpha\beta 1$  мыши и  $\alpha\beta 1$  крысы. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело содержит области VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 иллюстративных антител 1-10. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело содержит области VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 иллюстративных антител 1-10. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело конкурирует с и/или связывает тот же эпитоп, что и референсное антитело против интегрин  $\alpha\beta 1$ , содержащее области VH и VL иллюстративных антител 1-10.

В другом аспекте в данном изобретении представлено антитело, которое специфически связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, и имеет одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4 или 5) из следующих свойств: (i) связывается с высокой аффинностью, характеризующейся показателем  $KD \leq 20$  нМ (бивалентная аффинность), с  $\alpha\beta 1$  человека, и с аффинностью в 100 нМ (бивалентная аффинность) с  $\alpha\beta 6$  человека; (ii) блокирует взаимодействие  $\alpha\beta 1$  с его лигандом и/или  $\alpha\beta 6$  с его лигандом (например, с LAP и фибронектином); (iii) является зависимым от катионов (например, кальция и магния; или марганца) для связывания с  $\alpha\beta 1$  человека и/или с  $\alpha\beta 6$  человека; (iv) связывается с  $\alpha\beta 1$  на фибробластах; и (v) ингибирует ответ фибробластов на TGF $\beta$  (например, как оценивается в анализе на LPA-индуцированный PAI-1). В некоторых вариантах осуществления указанное антитело содержит области VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 иллюстративных антител 11-14. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело содержит области VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 иллюстративных антител 11-14. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело конкурирует с и/или связывает тот же эпитоп, что и референсное антитело, которое связывает как интегрин  $\alpha\beta 1$ , так и интегрин  $\alpha\beta 6$ , и содержит области VH и VL иллюстративных антител 11-14.

В другом аспекте в данном изобретении представлено антитело, которое специфически связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с одним или большим числом других RGD-связывающих интегринов, и имеет одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4 или 5) из следующих свойств: (i) связывается с высокой аффинностью, характеризующейся показателем  $KD \leq 20$  нМ (бивалентная аффинность), с  $\alpha\beta 1$  человека, и с аффинностью в 100 нМ (бивалентная аффинность) с другими RGD-связывающими интегринными; (ii) блокирует взаимодействие  $\alpha\beta 1$  с его лигандом и/или взаимодействие интегрин из семейства RGD с его лигандом (например, с LAP и фибронектином); (iii) является зависимым от катионов (например, кальция и магния; или марганца) или не зависимым от катионов для связывания с  $\alpha\beta 1$  человека и/или с RGD-связывающими интегринными; (iv) связывается с  $\alpha\beta 1$  на фибробластах и/или с RGD-связывающими интегринными на фибробластах; и (v) ингибирует ответ фибробластов на TGF $\beta$  (например, как оценивается в анализе на LPA-

индуцированный PAI-1). В некоторых вариантах осуществления указанное антитело является интернализированным. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с  $\alpha\beta 1$  яванской макаки,  $\alpha\beta 1$  мыши и  $\alpha\beta 1$  крысы. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело содержит области VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 иллюстративных антител 15-20.

5 В некоторых вариантах осуществления указанное антитело содержит области VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 иллюстративных антител 15-20. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело конкурирует с и/или связывает тот же эпитоп, что и референсное антитело, содержащее области VH и VL иллюстративных антител 15-20.

В другом аспекте в данном изобретении представлено антитело, которое специфически связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с одним или большим числом других RGD-связывающих интегринов, и имеет одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) из следующих свойств: (i) связывается с высокой аффинностью, характеризующейся показателем  $KD \leq 20$  нм (бивалентная аффинность), с  $\alpha\beta 1$  человека, и (если оно также связывает другие интегрины из семейства RGD) с аффинностью в 100 нМ (бивалентная аффинность) с другими RGD-связывающими интегринными; (ii) блокирует взаимодействие  $\alpha\beta 1$  с его лигандом и/или взаимодействие интегринна из семейства RGD с его лигандом (например, с LAP и фибронектином); (iii) является зависимым от катионов (например, кальция и магния; или марганца) или не зависимым от катионов для связывания с  $\alpha\beta 1$  человека и/или с RGD-связывающими интегринными; (iv) связывается с  $\alpha\beta 1$  на фибробластах и/или с RGD-связывающими интегринными на фибробластах; (v) ингибирует ответ фибробластов на TGF $\beta$  (например, как оценивается в анализе на LPA-индуцированный PAI-1); (vi) является интернализированным; (vii) связывается с  $\alpha\beta 1$  яванской макаки,  $\alpha\beta 1$  мыши и  $\alpha\beta 1$  крысы.

В другом аспекте в данном изобретении представлено антитело, которое связывается с интегрином  $\alpha\beta 1$ , но не с другими интегринными (например, другими интегринными из семейства RGD). Указанное антитело содержит область VH, содержащую VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, и область VL, содержащую VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, при этом VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 содержат: (i) SEQ ID NO:4, 6, 7, 8, 9 и 10, соответственно; (ii) SEQ ID NO:14, 16, 17, 18, 19 и 20, соответственно; (iii) SEQ ID NO:4, 6, 23, 24, 25 и 26, соответственно; (iv) SEQ ID NO:29, 6, 7, 8, 9 и 10, соответственно; (v) SEQ ID NO:32, 34, 17, 18, 19 и 20, соответственно; (vi) SEQ ID NO:37, 39, 40, 41, 42 и 43, соответственно; (vii) SEQ ID NO:37, 39, 46, 18, 47 и 48, соответственно; (viii) SEQ ID NO:52, 54, 55, 18, 19 и 56, соответственно; (ix) SEQ ID NO:60, 39, 55, 18, 19 и 56, соответственно; или (x) SEQ ID NO:63, 54, 55, 18, 19 и 56, соответственно.

30 В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанным аспектом антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:11, и область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:12; (ii) область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:21, и область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:22; (iii) область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:27, и область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична



14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:28; (iv) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:30, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:12; (v) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:35, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:22; (vi) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:44, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:45; (vii) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:49, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:50; (viii) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:57, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:58; (ix) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:61, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:58; (x) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:64, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:58.

В другом аспекте в данном изобретении представлено антитело, которое связывается как с интегрином  $\alpha\beta 1$ , так и с интегрином  $\alpha\beta 6$ , но не с другими интегринными (например, другими интегринными семейства RGD), при этом указанное антитело содержит область VH, содержащую VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, и область VL, содержащую VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, при этом VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 содержат: (i) SEQ ID NO:37, 39, 40, 65, 66 и 67, соответственно; (ii) SEQ ID NO:37, 39, 40, 65, 66 и 69, соответственно; (iii) SEQ ID NO:37, 39, 46, 18, 47 и 71, соответственно; или (iv) SEQ ID NO:37, 39, 73, 74, 42 и 75, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанным аспектом антитело, которое связывается как с интегрином  $\alpha\beta 1$ , так и с интегрином  $\alpha\beta 6$ , но не с другими интегринными, содержит: (i) область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:44, и область

VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:68; (ii) область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:44, и область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:70; (iii) область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:49, и область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:72; (iv) область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:76, и область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:77.

В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанным аспектом антитело, которое связывается как с интегрином  $\alpha\beta 1$ , так и с интегрином  $\alpha\beta 6$ , но не с другими интегринными, содержит: (i) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:44, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:68; (ii) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:44, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:70; (iii) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:49, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:72; (iv) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:76, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:77.

В другом аспекте в данном изобретении представлено антитело, которое связывается с интегрином  $\alpha\beta 1$  и с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 1\beta 3$ , при этом указанное антитело содержит область VH, содержащую VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, и область VL, содержащую VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, при этом VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 содержат: (i) SEQ ID NO:4, 6, 78, 79, 80 и 81, соответственно; (ii) SEQ ID NO:85, 87, 88, 89, 90 и 91, соответственно; (iii) SEQ ID NO:85, 87, 88, 89, 90 и 94, соответственно; (iv) SEQ ID NO:97, 99, 23, 24, 25, и 26, соответственно; (v) SEQ ID NO:14, 16, 17, 101, 102 и 103, соответственно; или (vi) SEQ ID NO:37, 39, 46, 105, 80 и 106, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанным аспектом антитело, которое связывается с интегрином  $\alpha\beta 1$  и с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 1\text{IB}\beta 3$ , содержит: (i) область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:82, и область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:83; (ii) область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:92, и область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:93; (iii) область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:92, и область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:95; (iv) область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:100, и область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:28; (v) область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:21, и область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:104; (vi) область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:49, и область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO:107.

В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанным аспектом антитело, которое связывается с интегрином  $\alpha\beta 1$  и с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 1\text{IB}\beta 3$ , содержит: (i) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:82, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:83; (ii) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:92, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:93; (iii) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:92, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или

1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:95; (iv) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:100, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:28; (v) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:21, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:104; (vi) область VH, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:49, и область VL, содержащую 20 или меньшее число (например, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1) замен, вставок или делеций в аминокислотных последовательностях, указанных в SEQ ID NO:107.

В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанными аспектами указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанными аспектами указанное антитело модифицировано для уменьшения или устранения эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанными аспектами указанное антитело содержит гликозилированную константную область человека. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанными аспектами указанное антитело содержит гликозилированную область Fc IgG1 человека, область Fc SAA IgG2 человека, область Fc IgG4(S228P) человека или гликозилированную область Fc IgG4(S228P)/G1 человека. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанными аспектами указанное антитело содержит константную область легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанными аспектами указанное антитело представляет собой полноразмерное антитело, антитело с одним доменом, гуманизованное антитело, химерное антитело, биспецифическое антитело, Fv, scFv, scFv-Fc, scFv-CH3, sc(Fv)2, sc(Fv)2-Fc, sc(Fv)2-CH3, диатело, наноантитело, Fab и F(ab')<sub>2</sub>. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанными аспектами указанное антитело дополнительно содержит фрагмент, продлевающий период полужизни. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанными аспектами указанное антитело дополнительно содержит обнаруживаемую метку (например, флуоресцентную метку). В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанными аспектами указанное антитело дополнительно содержит терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанными аспектами указанное антитело дополнительно содержит радиотерапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанными аспектами указанное антитело дополнительно содержит химиотерапевтический агент.

В другом аспекте в данном документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с любым из вышеперечисленных аспектов. В другом аспекте в данном документе представлен полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующий (-е) антитело в соответствии с любым из вышеперечисленных аспектов. Указанный полинуклеотид может кодировать антитело, которое связывается со своим интегрином семейства RGD (например,  $\alpha\beta1$ ,  $\alpha\beta6$ ,  $\alpha\beta1$  + другие интегрины семейства RGD) и

содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую три VH CDR или VH любого из иллюстративных антител 1-20. В других случаях указанный полинуклеотид может кодировать антитело, которое связывается со своим интегрином семейства RGD (например,  $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 1$  + другие интегрины семейства RGD) и содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую три VL CDR или VL любого из иллюстративных антител 1-20. В некоторых случаях указанный полинуклеотид может кодировать антитело, которое связывается со своим интегрином семейства RGD (например,  $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 1$  + другие интегрины семейства RGD) и содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую три VH CDR и три VL CDR любого из иллюстративных антител 1-20. В других случаях указанный полинуклеотид может кодировать антитело, которое связывается со своим интегрином семейства RGD (например,  $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 1$  + другие интегрины семейства RGD) и содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую VH и VL любого из иллюстративных антител 1-20. В другом аспекте в данном документе представлен вектор или векторы (например, вектор(ы) экспрессии), содержащий (-ие) полинуклеотид или полинуклеотиды в соответствии с вышеуказанным аспектом. В дополнительном аспекте в данном документе представлена клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или полинуклеотиды в соответствии с вышеуказанным аспектом, или вектор или векторы (например, вектор(ы) экспрессии) в соответствии с вышеуказанным аспектом.

В другом аспекте в данном документе представлен способ получения антитела против интегрин, способ, включающий в себя: (а) культивирование клетки-хозяина в условиях, которые позволяют экспрессировать указанное антитело; и (б) выделение указанного антитела. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанным аспектом указанный способ дополнительно включает в себя приготовление лекарственного состава антитела в виде стерильной композиции, пригодной для введения человеку.

В другом аспекте в данном документе представлен способ лечения или профилактики фиброза у субъекта-человека, нуждающегося в этом, способ, включающий в себя введение указанному субъекту-человеку терапевтически эффективного количества описанного в данном документе антитела против интегрин (например, иллюстративные антитела 1-20). В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанным аспектом фиброз выбран из группы, состоящей из: фиброза печени, фиброза легких, фиброза почек, фиброза сердца, артрофиброза, фиброза средостения, миелофиброза, нефрогенного системного фиброза, болезни Пейрони, прогрессивного массивного фиброза, фиброза малых дыхательных путей, фиброза, связанного с хроническим обструктивным заболеванием легких, и забрюшинного фиброза. В некоторых вариантах осуществления фиброз представляет собой фиброз печени. В некоторых вариантах осуществления фиброз представляет собой идиопатический фиброз легких. В некоторых вариантах осуществления фиброз представляет собой склеродермию/системный склероз.

В другом аспекте в данном документе представлен способ лечения или профилактики рака у субъекта-человека, нуждающегося в этом, способ, включающий в себя введение указанному субъекту-человеку терапевтически эффективного количества описанного в данном документе антитела против интегрин (например, иллюстративные антитела 1-20). В некоторых вариантах осуществления в соответствии с вышеуказанным аспектом рак имеет эпителиальное происхождение, и при этом, необязательно, рак эпителиального происхождения представляет собой плоскоклеточную карциному, аденокарциному, переходно-клеточную карциному или базально-клеточную карциному. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из: рака поджелудочной железы, рака молочной железы, меланомы, рака предстательной железы, рака яичника, рака шейки матки, опухолей головного мозга и центральной нервной системы, и глиобластомы.

В другом аспекте в данном документе представлен способ ингибирования агрегации тромбоцитов у субъекта-человека, нуждающегося в этом, способ, включающий в себя введение указанному субъекту-человеку терапевтически эффективного количества описанного в данном документе антитела против интегрина (например, иллюстративные антитела 1-20). В некоторых вариантах осуществления в соответствии с  
5 вышеуказанным аспектом указанное ингибирование предназначено для лечения острого коронарного синдрома.

В другом аспекте в данном документе представлен способ лечения или профилактики офтальмологического заболевания или нарушения у субъекта-человека, нуждающегося в этом, способ, включающий в себя введение указанному субъекту-человеку терапевтически эффективного количества описанного в данном документе антитела против интегрина (например, иллюстративные антитела 1-20). В некоторых вариантах  
10 осуществления в соответствии с вышеуказанным аспектом указанное офтальмологическое заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из: возрастной макулярной дегенерации (ВМД), влажной ВМД, макулярного отека и диабетической ретинопатии.

В другом аспекте в данном документе представлен способ лечения или профилактики острого поражения почек, острого поражения легких или острого поражения печени у субъекта-человека, нуждающегося в этом, способ, включающий в себя введение указанному субъекту-человеку терапевтически эффективного количества описанного в данном документе антитела против интегрина (например, иллюстративные антитела 1-20).  
15

В другом аспекте в данном документе представлен способ лечения или профилактики неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) у субъекта-человека, нуждающегося в этом, способ, включающий в себя введение указанному субъекту-человеку терапевтически эффективного количества описанного в данном документе антитела против интегрина (например, одного или большего числа из иллюстративных антител 1-20). В некоторых вариантах осуществления НАЖБП представляет собой неалкогольный стеатогепатит (НАСГ).  
20

В другом аспекте в данном документе представлен способ идентификации антитела, которое специфически связывается с интегрином  $\alpha\beta 1$ , но не с другими интегринными из популяции антител, способ, включающий в себя отбор антитела с использованием направленного отбора с помощью направляющего антитела, которое представляет собой любое антитело против интегрина, описанное в данном документе (например, иллюстративные антитела 1-20). В некоторых вариантах осуществления указанное направляющее антитело содержит шесть CDR любого из иллюстративных антител 5, 11 и 12. В некоторых вариантах осуществления указанное направляющее антитело содержит VH и/или VL любого из иллюстративных антител 5, 11 и 12. В некоторых вариантах осуществления указанная популяция антител содержит библиотеку антител, экспрессируемую на поверхности прокариотических клеток. В некоторых вариантах осуществления указанная популяция антител содержит библиотеку антител, экспрессируемую на поверхности эукариотических клеток. В некоторых вариантах осуществления указанная популяция антител содержит библиотеку антител, экспрессируемую на поверхности клеток дрожжей. В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает в себя этап отбора антитела, которое связывается с полипептидом или полипептидами, содержащим (-и) внеклеточные домены  $\alpha\gamma$  и  $\beta 1$ , при этом, необязательно, указанный этап выполняется при отсутствии катионов, в присутствии кальция и магния или в присутствии марганца, а также при этом, необязательно, указанный отбор выполняется с помощью клеточной сортировки с магнитной активацией (MACS) и/или клеточной сортировки с активацией флуоресценции (FACS). В некоторых вариантах осуществления указанные способы дополнительно включают в себя истощение антител, которые  
35  
40

связываются с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ ,  $\alpha\nu\beta 6$ ,  $\alpha\nu\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 4\beta 1$ . В некоторых вариантах осуществления указанные способы дополнительно включают в себя обогащение антител, которые специфически связываются с интегрином  $\alpha\nu\beta 1$ , путем отбора антител, которые связываются с интегрином  $\alpha\nu\beta 1$ . Указанный отбор может осуществляться за один или большее число циклов (например, за один, два, три, четыре или пять циклов). В некоторых вариантах осуществления указанные способы дополнительно включают в себя обеспечение созревания аффинности отобранных антител.

В другом аспекте в данном документе представлен способ идентификации антитела из популяции антител, при этом указанное антитело специфически связывается как с интегрином  $\alpha\nu\beta 1$ , так и с интегрином  $\alpha\nu\beta 6$ , способ, включающий в себя отбор антитела с использованием направленного отбора с помощью направляющего антитела, которое представляет собой любое антитело против интегрин, описанное в данном документе (например, одно или большее число из иллюстративных антител 1-20). В некоторых вариантах осуществления указанное направляющее антитело содержит шесть CDR любого из иллюстративных антител 5, 11 и 12. В некоторых вариантах осуществления указанное направляющее антитело содержит VH и/или VL любого из иллюстративных антител 5, 11 и 12. В некоторых вариантах осуществления указанная популяция антител содержит библиотеку антител, экспрессируемую на поверхности прокариотических клеток. В некоторых вариантах осуществления указанная популяция антител содержит библиотеку антител, экспрессируемую на поверхности эукариотических клеток. В некоторых вариантах осуществления указанная популяция антител содержит библиотеку антител, экспрессируемую на поверхности клеток дрожжей. В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает в себя этап отбора антитела, которое связывается с полипептидом или полипептидами, содержащим (-и) внеклеточные домены  $\alpha\nu$  и  $\beta 1$ , и/или внеклеточные домены  $\alpha\nu$  и  $\beta 6$ , при этом, необязательно, указанный этап выполняется при отсутствии катионов, в присутствии кальция и магния или в присутствии марганца, а также при этом, необязательно, указанный отбор выполняется с помощью MACS и/или FACS. В некоторых вариантах осуществления указанный способ дополнительно включает в себя истощение антител, которые связываются с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ ,  $\alpha\nu\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 4\beta 1$ . В некоторых вариантах осуществления указанный способ дополнительно включает в себя обогащение антител, которые специфически связываются с интегринными  $\alpha\nu\beta 1$  и  $\alpha\nu\beta 6$ , путем отбора антител, которые связываются с интегринными  $\alpha\nu\beta 1$  и  $\alpha\nu\beta 6$ . Указанный отбор может осуществляться за один или большее число циклов (например, за один, два, три, четыре или пять циклов). В некоторых вариантах осуществления указанный способ дополнительно включает в себя обеспечение созревания аффинности отобранных антител.

Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое, как правило, подразумевается рядовым специалистом в данной области техники, к которой относится данное изобретение. Несмотря на то, что способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, можно применять на практике или при испытании данного изобретения, иллюстративные способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, полностью включены в данный документ посредством ссылки. В случае противоречия данная заявка, включающая определения, будет иметь преимущественную силу. Материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не предназначены быть ограничивающими.

Другие признаки и преимущества данного изобретения будут очевидны из следующего подробного описания

и из формулы изобретения.

## ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фиг. 1** изображена обобщенная схема сортировки  $\alpha\nu\beta 1$ -специфических антител,  $\alpha\nu\beta 1/\alpha\nu\beta 6$ -специфических антител и антител, специфических в отношении  $\alpha\nu\beta 1$  плюс один или большее число интегринов.

На **фиг. 2А-2К** показаны примеры наблюдаемой кинетики связывания для  $\alpha\nu\beta 1$ -специфических, неспецифических и частично селективных антител.

На **фиг. 3А-3Е** показаны примеры наблюдаемой кинетики связывания для  $\alpha\nu\beta 1$ -специфических, неспецифических и частично селективных антител.

На **фиг. 4А-4J** показана аффинность моновалентного связывания для рекомбинантного  $\alpha\nu\beta 1$ .

На **фиг. 5А-5Е** показаны примеры наблюдаемого связывания для концентрационных серий  $\alpha\nu\beta 1$ -специфических, неспецифических и частично селективных антител.

На **фиг. 6А-6J** показаны примеры наблюдаемого связывания для концентрационных серий  $\alpha\nu\beta 1$ -специфических, неспецифических и частично селективных антител.

На **фиг. 7А-7Е** изображены примеры  $\alpha\nu\beta 1$ -ингибирования адгезии LAP.

На **фиг. 8** показаны примеры  $\alpha 4\beta 1$ -ингибирования адгезии VCAM.

На **фиг. 9А-9D** представлены примеры наблюдаемого связывания с MRC9 (клетки-фибробласты человека) и BLO-11 (клетки-фибробласты мыши).

На **фиг. 10А-10С** изображены примеры ингибирования PAI-1.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном изобретении представлены антитела, которые связываются с интегринными, такими как RGD-связывающие интегрины. Представлены антитела, которые специфически связывают интегрин  $\alpha\nu\beta 1$ . В некоторых случаях в данном документе представлены антитела, которые связываются с интегрином  $\alpha\nu\beta 1$ , но не с другими интегринными (например, указанные антитела не связываются с другими RGD-связывающими интегринными или с другими гетеродимерами интегринного, содержащими  $\alpha\nu$  или  $\beta 1$ ). Также в данном документе представлены антитела, которые связываются как с интегрином  $\alpha\nu\beta 1$ , так и с интегрином  $\alpha\nu\beta 6$ , но не с другими интегринными (например, указанные антитела не связываются с другими RGD-связывающими интегринными или с другими гетеродимерами интегринного, содержащими  $\alpha\nu$ ,  $\beta 1$  или  $\beta 6$ ). В некоторых случаях в данном документе представлены антитела, которые связываются с  $\alpha\nu\beta 1$  и одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из:  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ ,  $\alpha\nu\beta 6$ ,  $\alpha\nu\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 11\beta 3$ . Антитела, описанные в данном документе, полезны для лечения или профилактики нарушений, таких как любое фиброзирующее заболевание, или патологических состояний, рака (например, эпителиального рака) и офтальмологических заболеваний.

### Интегрины

$\alpha\nu$ -интегрины ( $\alpha\nu\beta 1$ ,  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ ,  $\alpha\nu\beta 6$  и  $\alpha\nu\beta 8$ ) обладают способностью связывать и активировать про-фиброзный цитокин – трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ), и вовлечены в различные фиброзирующие заболевания и раковые заболевания. Блокирование  $\alpha\nu$ -интегринов потенциально может уменьшить эффекты сигнального пути TGF $\beta$  ниже по каскаду. Интегрин  $\alpha\nu\beta 1$  имеет высокий уровень экспрессии на активированных фибробластах, непосредственно связывается с ассоциированным с латентностью пептидом (LAP) TGF $\beta 1$  и опосредует активацию TGF $\beta 1$ , что делает желательным генерирование антител против

интегрина  $\alpha\beta 1$ . Однако из-за того, что субъединицы  $\alpha$  и  $\beta 1$  по отдельности присутствуют в многочисленных парах димеров интегрин, было чрезвычайно сложно сгенерировать гетеродимер-специфические антитела против интегрин  $\alpha\beta 1$  (см., например, Reed et al., *Science Translational Medicine*, 7 (288): 288ra79 (2015); Wilkinson et al., *Eur. J Pharmacol.*, 842 (2019) 239-247). В действительности, в данной области техники не было

5

описано подобных специфичных к интегрину антител против  $\alpha\beta 1$ . Интегрин  $\alpha\beta 6$  является представителем RGD-связывающих интегринов. В то время как  $\alpha$ -субъединица может образовывать гетеродимер со множеством  $\beta$ -субъединиц ( $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$  и  $\beta 8$ ),  $\beta 6$ -субъединица может экспрессироваться в виде гетеродимера только с  $\alpha$ -субъединицей. Внеклеточные и цитоплазматические домены  $\beta 6$ -субъединицы опосредуют различные клеточные функции: было показано, что внеклеточные и

10

трансмембранные домены опосредуют активацию TGF- $\beta$  и адгезию; в то время как цитоплазматический домен  $\beta 6$ -субъединицы содержит уникальную последовательность из 11 аминокислот, которая важна в опосредовании  $\alpha\beta 6$ -регулируемой клеточной пролиферации, продукции MMP, миграции и способствует выживанию.

$\alpha$ -субъединица интегрин также известна как ITGAV, CD51, MSK8, VNRA, VTNR, рецептор витронектина или альфа V субъединица интегрин. Аминокислотная последовательность белка  $\alpha$  интегрин человека (код

15

белка в базе Uniprot: P06756-1) представлена ниже.

```
MAFPPRRRLRLGPRGLPLLLSGLLLPLCRAFNLVDSPA EYSGPEGSYFGFAVDFFVPSASSRMFLLVGAPK
ANTTQPGIVEGGQVLKCDWSSTRRCQPIEFDATGNRDYAKDDPLEFKSHQWFGASVRSKQDKILACAPLY
HWRTEMKQEREPVGT CFLQDGTKTVEYAPCRSQDIDADGQGF CQGGFSIDFTKADR VLLGGPGSFYWQG
QLISDQVAEIVSKYDPNVYSIKYNNQLATRTAQAIFFD SYLGYSAVVGDFNGDGIDDFVSGVPRAARTLGM
VYIYDGKNMSSLYNFTGEQMAAYFGFSVAATDINGDDYADVFIGAPLFMDRGS DGKLQEVGQVSVSLQR
ASGDFQTTKLN GFV FARFGSAIAPLGDLDQDGFNDIAIAAPYGGEDKKGIVYIFNGRSTGLNAVPSQILEG
QWAARSMPPSFGYS MKGATDIDKNGYPDLIVGAFGVDRAILYRARPVITVNAGLEVYPSILNQDNKTCSLP
GTALKVSCFNVRFC LKADGKGVLPRKLNQVELLLDKLKQKGAIRRALFLYSRSPSHSKNMTISRGGMLMQ
CEELIAYLRDESEFRDKLTPITIFMEYRLDYRTAADTTGLQPILNQFT PANISRQAHILLDCGEDNVCKPKLE
VSVSDSQKKIYIGDDNPLTLIVKAQNQEGEYAEELIVSIPLQADFIGVVRNNEALARLSCAFKTENQTRQV
VCDLGNPMKAGTQLLAGLRFSVHQSEMDSVKFDLQIQSSNLFDKVSPV VSHKVDLAVLAAVEIRGVSS
PDHVFLPIPNWEHKENPETEEDVGPVVQHIELRNNGPSSFSKAMLHLQWPYKYNNTLLYLHYDIDGPM
NCTSDMEINPLRIKISSLQTTEKNDTVAGQGERDHLITKRDLALSEGDIHTLGC GVAQCLKIVCQVGRLD RG
KSAILYVKSLWLTETFMNKENQNH SYSLKSSASFNVIEFPYKNLPIEDITNSTLVTTNVTWGIQAPMPVPV
WVILAVLAGLLLLAVLVFVMYRMGFFKVRPPQEEQEREQLQPHENGE GNSSET(SEQ ID NO: 1)
```

20

25

30

$\beta 1$ -субъединица интегрин также известна как ITGB1, CD29, FNRB, GPIIA, MDF2, MSK12, VLA-BETA, VLAB или бета 1 субъединица интегрин. Аминокислотная последовательность белка  $\beta 1$  интегрин человека

35

```
MNLQPIFWIGLISSVCCVFAQT DENRCLKANAKSCGECIQAGPNCGWCTNSTFLQEGMPTSARCDDLEALK
KKGCPPDDIENPRGSKDIKKNK NVTNRSKGTAEKLPEDITQIQPQQLVLR LRSGEPTFTLKFKAEDYPI
DLYYLMDSL SYSMKDDLENVKS LGTDL MNEMRRITSDFRIGFGSFVEKTVMPYISTTPAKLRNPCTSEQNCT
SPFSYKNVLSL TNKGEVFNELVGKQRISGNLDSPEGGFD AIMQVA VCGSLIGWRNVTRLLVFST DAGHFHA
GDGKLG GIVLPNDGQCHLENNMYTMSHYDYPSIAHLVQKLS ENNIQTIFAVTEEFQPVYKELKNLIPKSA
VGTL SANSSNVIQLIIDAYNSLSSEVILENGK LSEGVTISYKSYCKNGVNGTG ENGRKCSNISIGDEVQFEISIT
```

40

SNKCPKSDSDFKIRPLGFTEEEVILQYICECECQSEGIPESPKCHEGNGTFECGACRCNEGRVGRHCECST  
 DEVNSEMDAYCRKENSSEICSNNGECVCGQCVCRRDNTNEIYSGKFCECDNFNCDRSNGLICGGNGVC  
 KCRVCECNPNYTGSACDCSLDTSTCEASNGQICNNGRGICECGVCKCTDPKFQGGQTCEMCQTCLGVCAEHK  
 ECVQCRAFNGKEKDDTCTQEQSYFNITKVESRDKLPQVPQDPVSHCKEKDVDDCWFYFTYSVNGNNEV  
 5 MVHVVENPECPTGPDIIPIVAGVVAGIVLIGLALLLIWKLMIHDRREFAKFEKEKMNAKWDGTGEN  
 PIYKSAVTTVVNPKYEGK(**SEQ ID NO: 2**)

β6-субъединица интегрина также известна как ITGB6, A11H или бета 6 субъединица интегрина.  
 Аминокислотная последовательность белка β6 интегрина человека (код белка в базе Genbank®: NP\_000879.2)  
 10 представлена ниже.

1 mgiellclff lflgrndhqv ggcalggaet cedelligpq cawcaqenft hpsgvgercd  
 61 tpanllakgc qlnfienvps qveilknpkpl svgrqknssd ivqiapqslilklrpggaqt  
 121 lqvhrvrted ypvdylylmd lsasmdddlntikelgsrls kemskltsnf rlgfgsfvek  
 181 pvspfvkttp eeianpcssi pyfclptfgf khilplntda erfneivknq kisanidtpc  
 15 241 ggfdaimqaa vckekigwrn dslhlvfvsvdadshfgmnd klagivipnd glchldskne  
 301 ysmstvleyp tigqlidklv qnnvllifav tqeqvhlyen yaklipgatv gllqkdsgni  
 361 lqliisayee lrsevelevl gdtcglntsf taicnngtlf qhqkckshmk vgdtsasvst  
 421 vniphcerrs rhiikpvgl gdalellvsp ecncdcqkev evnsskchhg ngsfqcgvca  
 481 chpghmgprc ecgedmlstd sckcapdhps csgrgdcycg qcichlspyg niygpqcqd  
 20 541 nfscvrhkg lcgngdcdc gecvcrsgwt geycncttst dscvsedgvl csgrgdcvcg  
 601 kvctnpgas gptcercptc gdpnksrsc iechlsaagq arecvdkck lagatiseee  
 661 dfskdgsvsq slqgenecli flittdneg ktihsinek dcpkppnimp imlgvslail  
 721 ligvllciw kllvsfhdrc evakfeasers kakwqtgtnp lyrgststfk nvykhrekq  
 781 kvdlstdc (**SEQ ID NO:116**)

Иллюстративную аминокислотную последовательность белка β3 интегрина человека можно найти в  
 базе Genbank® под кодом NP\_000203.2. Иллюстративную аминокислотную последовательность белка β5  
 интегрина человека можно найти в базе Genbank® под кодом NP\_002204.2. Иллюстративную  
 аминокислотную последовательность белка β8 интегрина человека можно найти в базе Genbank® под кодом  
 30 NP\_002205.1. Иллюстративную аминокислотную последовательность белка α5 интегрина человека можно  
 найти в базе Genbank® под кодом NP\_002196.4. Иллюстративную аминокислотную последовательность белка  
 α8 интегрина человека можно найти в базе Genbank® под кодом NP\_001278423.1. Иллюстративную  
 аминокислотную последовательность белка α11B интегрина человека можно найти в базе Genbank® под кодом  
 NP\_000410.2.

35 Внеклеточный участок альфа V субъединицы интегрина соответствует аминокислотам 31-993 SEQ ID NO:1.  
 Внеклеточный участок бета 1 субъединицы интегрина соответствует аминокислотам 21-728 SEQ ID NO:2.

#### Антитела против интегрина

Все представленные в данном документе антитела против интегрина связываются с αvβ1. В некоторых  
 40 случаях указанные антитела специфичны в отношении αvβ1 и не связывают другие интегрины. В некоторых  
 случаях указанные антитела также связывают αvβ6, но не другие интегрины. В других случаях указанные

антитела связываются с одним или большим числом RGD-связывающих интегринов, выбранными из группы, состоящей из  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha v\beta 6$ ,  $\alpha v\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha IIb\beta 3$ .

В некоторых случаях представленные в данном документе антитела блокируют взаимодействие интегрин, с которым связывается указанное антитело, со своим лигандом. Например, указанное антитело против интегрин блокирует взаимодействие  $\alpha v\beta 1$  со своим лигандом (например, LAP и фибронектином). В некоторых случаях указанное антитело против интегрин блокирует взаимодействие  $\alpha v\beta 6$  со своим лигандом (например, LAP и фибронектином). В некоторых случаях представленные в данном документе антитела являются зависимыми от катионов для связывания своей цели (например, зависимыми от кальция и магния; или марганца). Примерами таких антител являются иллюстративные антитела 1, 2, 4-14, 16, 17, 19 и 20. В некоторых случаях представленные в данном документе антитела являются не зависимыми от катионов для связывания своей цели. Примерами таких антител являются иллюстративные антитела 3, 15 и 18.

В некоторых случаях представленные в данном документе антитела связывают свой целевой интегрин (например,  $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 6$ ) на фибробластах. Фибробласты представляют собой тип клеток, ответственный за отложение внеклеточного матрикса при фиброзирующих заболеваниях.

В некоторых случаях представленные в данном документе антитела ингибируют ответ фибробластов на TGF $\beta$ .

В некоторых случаях одно или большее число из представленных в данном документе антител являются интернализированными. Примерами таких антител являются иллюстративные антитела 4, 5, 17 и 19. Интернализированные антитела могут применяться для доставки в клетку агента, который необходимо доставить (например, небольшой молекулы или внутриклеточного вещества).

В некоторых случаях одно или большее число из представленных в данном документе антител связываются с  $\alpha v\beta 1$  яванской макаки,  $\alpha v\beta 1$  мыши или  $\alpha v\beta 1$  крысы. Примерами таких антител являются иллюстративные антитела 4, 5, 17 и 19.

В определенных случаях в данном изобретении представлено антитело, которое специфически связывается с  $\alpha v\beta 1$  человека и имеет одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4 или 5) из следующих свойств: (i) связывается с высокой аффинностью, характеризующейся показателем константы диссоциации (KD)  $\leq 20$  нм (бивалентная аффинность), с  $\alpha v\beta 1$  человека; (ii) блокирует взаимодействие  $\alpha v\beta 1$  с его лигандом (например, с ассоциированным с латентностью пептидом (LAP) и фибронектином); (iii) является зависимым от катионов (например, кальция и магния; или марганца) или не зависимым от катионов для связывания с  $\alpha v\beta 1$  человека; (iv) связывается с  $\alpha v\beta 1$  на фибробластах; и (v) ингибирует ответ фибробластов на TGF $\beta$  (например, как оценивается в анализе на LPA-индуцированный PAI-1).

В определенных случаях в данном изобретении представлено антитело, которое специфически связывается как с  $\alpha v\beta 1$  человека, так и с  $\alpha v\beta 6$  человека, и имеет одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4 или 5) из следующих свойств: (i) связывается с высокой аффинностью, характеризующейся показателем KD  $\leq 20$  нм (бивалентная аффинность), с  $\alpha v\beta 1$  человека, и с аффинностью в 100 нм (бивалентная аффинность) с  $\alpha v\beta 6$  человека; (ii) блокирует взаимодействие  $\alpha v\beta 1$  с его лигандом и/или  $\alpha v\beta 6$  с его лигандом (например, с LAP и фибронектином); (iii) является зависимым от катионов (например, кальция и магния; или марганца) для связывания с  $\alpha v\beta 1$  человека и/или с  $\alpha v\beta 6$  человека; (iv) связывается с  $\alpha v\beta 1$  на фибробластах; и (v) ингибирует ответ фибробластов на TGF $\beta$  (например, как оценивается в анализе на LPA-индуцированный PAI-1).

В определенных случаях в данном изобретении представлено антитело, которое специфически связывается как с  $\alpha v\beta 1$  человека, так и с одним или большим числом других RGD-связывающих интегринов, и имеет одно

или большее число (например, 1, 2, 3, 4 или 5) из следующих свойств: (i) связывается с высокой аффинностью, характеризующейся показателем  $KD \leq 20$  нм (бивалентная аффинность), с  $\alpha v\beta 1$  человека, и с аффинностью в 100 нМ (бивалентная аффинность) с другими RGD-связывающими интегринными; (ii) блокирует взаимодействие  $\alpha v\beta 1$  с его лигандом и/или взаимодействие интегринного из семейства RGD с его лигандом (например, с LAP и фибронектином); (iii) является зависимым от катионов (например, кальция и магния, или марганца) или не зависимым от катионов для связывания с  $\alpha v\beta 1$  человека и/или с RGD-связывающими интегринными; (iv) связывается с  $\alpha v\beta 1$  на фибробластах и/или с RGD-связывающими интегринными на фибробластах; и (v) ингибирует ответ фибробластов на TGF $\beta$  (например, как оценивается в анализе на LPA-индуцированный PAI-1).

Употребление термина «антитело» в данном документе предназначено для охвата полноразмерного антитела (в отличие от миниантитела, наноантитела или фрагмента антитела), биспецифического антитела, четырехвалентного антитела, полиспецифического антитела, миниантитела, наноантитела и фрагментов антител. В некоторых случаях представленное в данном документе антитело против интегринного представляет собой полноразмерное антитело. В определенных случаях константная область тяжелой цепи антитела против интегринного представляет собой константную область IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека или IgG4 человека. В определенных случаях константная область легкой цепи представляет собой константную область каппа человека. В других случаях константная область легкой цепи представляет собой константную область лямбда человека. В некоторых случаях представленные в данном документе антитела сконструированы так, чтобы иметь низкую способность к эффекторным функциям (например, с помощью Fc-модификаций, таких как N297Q, T299A и т. п. См. также работу Wang, X., Mathieu, M. & Brezski, R.J. *Protein Cell* (2018) 9: 63. doi.org/10.1007/s13238-017-0473-8 (включена в данный документ посредством ссылки)). В некоторых случаях Fc-фрагментом указанного антитела является Fc IgG1 человека, Fc IgG2 человека, Fc IgG3 человека, Fc IgG4 человека, Fc агликозилированного IgG1 человека, Fc SAA IgG2 человека, Fc IgG4(S228P) человека или Fc агликозилированного IgG4(S228P)/G1 человека (в данном формате, который минимизирует эффекторную функцию, домены CH1 и CH2 представляют собой агликозилированный IgG4 с «фиксированным» шарниром (S228P). Домен CH3 представляет собой IgG1 человека или Fc агликозилированного IgG4(S228P) человека. В одном случае указанное антитело имеет одну из следующих трех стержневых структур со сниженной эффекторной функцией: агликозилированный IgG1 человека (N297Q); SAA IgG2 человека (см. Vafa et al. *Methods*, 65 (1): 114-26 (2014); и агликозилированный IgG4P/G1 человека (см. US 2012/0100140 A1).

Для удобства описания представленные в данном документе антитела против интегринного разделены на три группы, а именно – группы I-III.

Антитела группы I представляют собой антитела, которые связываются с  $\alpha v\beta 1$ -интегрином и никаким другим интегрином (например, другими  $\alpha v$ - или  $\beta 1$ -содержащими интегринными, или интегринными семейства RGD).

Антитела группы II представляют собой антитела, которые связываются с  $\alpha v\beta 1$ -интегрином и с  $\alpha v\beta 6$ -интегрином, но ни с какими другими интегринными. Наконец, антитела группы III представляют собой антитела, которые связываются с  $\alpha v\beta 1$ -интегрином и с одним или большим числом интегринных, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha v\beta 6$ ,  $\alpha v\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha IIb\beta 3$ . Указанные три группы антител более подробно описаны ниже.

#### A. Группа I (специфические антитела против интегринного $\alpha v\beta 1$ )

Многочисленные публикации указывают на сложности, связанные с генерированием антител, специфических в отношении интегрин  $\alpha\beta 1$ . Отчасти это связано с тем фактом, что субъединицы  $\alpha$  и  $\beta 1$  по отдельности присутствуют в многочисленных парах димеров интегрин (Reed et al., *Sci Transl Med.*, 7: 288 (2015)). Авторы данного изобретения добились успеха в генерировании таких антител, специфических в отношении интегрин  $\alpha\beta 1$ .

Соответственно, в данном документе представлены антитела, которые специфически связываются с интегрином  $\alpha\beta 1$  и которые не связываются с другими интегринными. В некоторых случаях указанные антитела не связывают другие  $\alpha$ - или  $\beta 1$ -содержащие гетеродимеры интегрин. В некоторых случаях указанные антитела против  $\alpha\beta 1$  не связывают другие RGD-интегрины (например, интегрины  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha IIB\beta 3$ ). Все указанные антитела связывают интегрин  $\alpha\beta 1$  человека. Такие антитела включают в себя иллюстративные антитела 1-10, которые связываются с высокой аффинностью, характеризующейся показателем  $KD \leq 20$  нм (бивалентная аффинность), с  $\alpha\beta 1$  человека.

#### *Иллюстративное антитело 1*

Иллюстративное антитело 1 специфически связывает  $\alpha\beta 1$  человека. Аминокислотные последовательности областей, определяющих комплементарность (CDR), и зрелых переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи иллюстративного антитела 1 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	SYVMH (SEQ ID NO:3)	YTFTSYVMH (SEQ ID NO:4)
VH CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:5)	IINPSGGSTS (SEQ ID NO:6)
VH CDR3	QQRHRRDYDYYYGMDV (SEQ ID NO:7)	QQRHRRDYDYYYGMDV (SEQ ID NO:7)
VL CDR1	RASQSVSSDYLA (SEQ ID NO:8)	RASQSVSSDYLA (SEQ ID NO:8)
VL CDR2	GASRRAT (SEQ ID NO:9)	GASRRAT (SEQ ID NO:9)
VL CDR3	QQAYSLPPT (SEQ ID NO:10)	QQAYSLPPT (SEQ ID NO:10)

#### *Переменная область тяжелой цепи (VH):*

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVT  
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARQQRHRRDYDYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:11)

#### *Переменная область легкой цепи (VL):*

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSDYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDF  
LTISRLEPEDFAVYYCQQAYSLPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:12)

В некоторых случаях антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 1. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, по IMGT или по Онеггеру. Указанные CDR могут быть определены, например, с помощью базы данных AbYsis ([www.bioinf.org.uk/abysis/sequence\\_input/key\\_annotation/key\\_annotation.cgi](http://www.bioinf.org.uk/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi)).

В одном случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:4, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:7; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:9, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:10. В другом случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:3, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:7; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:9, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:10.

В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:11. В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:12. В одном случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:11, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:12. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:11, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:12. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:11, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:12. В определенных случаях представленное в данном документе антитело, которое связывается с  $\alpha\beta 1$ , представляет собой антитело, которое конкурирует или связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:11, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:12.

#### Иллюстративное антитело 2

Иллюстративное антитело 2 специфически связывает  $\alpha\beta 1$  человека. Аминокислотные

последовательности CDR и зрелых переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи иллюстративного антитела 2 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	SYGMH (SEQ ID NO:13)	FTFSSYGMH (SEQ ID NO:14)
VH CDR2	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:15)	VISYDGSNKY (SEQ ID NO:16)
VH CDR3	GGPTRGDGTRVYYYGMDV (SEQ ID NO:17)	GGPTRGDGTRVYYYGMDV (SEQ ID NO:17)
VL CDR1	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:18)	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:18)
VL CDR2	SASTRAT (SEQ ID NO:19)	SASTRAT (SEQ ID NO:19)
VL CDR3	QQYYHHPFT (SEQ ID NO:20)	QQYYHHPFT (SEQ ID NO:20)

5

*VH:*

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFT  
ISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGGPTRGDGTRVYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:21)

10

*VL:*

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYSASTRATGIPARFSGSGSGTEFTL  
TISSLQSEDFAVYYCQQYYHHPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:22)

15

В некоторых случаях антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 2. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGT или по Онеггеру. Указанные CDR могут быть определены, например, с помощью базы данных AbYsis.

20

В одном случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:14, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:16, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID

NO:19, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:20. В другом случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:15, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:20. В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:21. В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:22. В одном случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:21, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:22. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:21, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:22. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:21, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:22. В определенных случаях представленное в данном документе антитело, которое связывается с  $\alpha\beta 1$ , представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22.

### *Иллюстративное антитело 3*

Иллюстративное антитело 3 специфически связывает  $\alpha\beta 1$  человека. Данное антитело проявляет не зависящее от катионов связывание со своей целью. Аминокислотные последовательности CDR и зрелых переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи иллюстративного антитела 3 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	SYVMH (SEQ ID NO:3)	YTFTSYVMH (SEQ ID NO:4)
VH CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:5)	IINPSGGSTS (SEQ ID NO:6)
VH CDR3	ETNYRGGPAFDI (SEQ ID NO:23)	ETNYRGGPAFDI (SEQ ID NO:23)

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VL CDR1	RSSQSLLSHNGYNYLD (SEQ ID NO:24)	RSSQSLLSHNGYNYLD (SEQ ID NO:24)
VL CDR2	LGSNRAS (SEQ ID NO:25)	LGSNRAS (SEQ ID NO:25)
VL CDR3	MQVLGTPPWT (SEQ ID NO:26)	MQVLGTPPWT (SEQ ID NO:26)

*VH:*

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVT  
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARETNYRGGPAFDIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:27)

5

*VL:*

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSG  
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQVLGTPPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:28)

- 10 В некоторых случаях антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 3. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGT или по Онеггеру. Указанные CDR могут быть определены, например, с помощью базы данных AbYsis.
- 15 В одном случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:4, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:23; и (ii)
- 20 область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:26. В другом случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:3, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, и
- 25 область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:23; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:26. В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на
- 30 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:27. В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:28. В одном случае

указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:27, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:28. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:27, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:28. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:27, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:28. В определенных случаях представленное в данном документе антитело, которое связывается с  $\alpha\beta 1$ , представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:27, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:28.

#### Иллюстративное антитело 4

Иллюстративное антитело 4 специфически связывает  $\alpha\beta 1$  человека, а также связывается с  $\alpha\beta 1$  яванской макаки,  $\alpha\beta 1$  мыши и  $\alpha\beta 1$  крысы. Иллюстративное антитело 4 является интернализированным. Аминокислотные последовательности CDR и зрелых переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи иллюстративного антитела 4 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	SYYMН (SEQ ID NO:3)	FTFTSYYMН (SEQ ID NO:29)
VH CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:5)	IINPSGGSTS (SEQ ID NO:6)
VH CDR3	QQRHRRDYDYYGMDV (SEQ ID NO:7)	QQRHRRDYDYYGMDV (SEQ ID NO:7)
VL CDR1	RASQSVSSDYLA (SEQ ID NO:8)	RASQSVSSDYLA (SEQ ID NO:8)
VL CDR2	GASRRAT (SEQ ID NO:9)	GASRRAT (SEQ ID NO:9)
VL CDR3	QQAYSLPPT (SEQ ID NO:10)	QQAYSLPPT (SEQ ID NO:10)

20

VH:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVT  
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARQQRHRRDYDYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:30)

VL:

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSDYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFT  
LTISRLEPEDFAVYYCQQAYSLPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:12)

5

В некоторых случаях антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 4. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGT или по Онеггеру. Указанные CDR могут  
10 быть определены, например, с помощью базы данных AbYsis.

10

В одном случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:29, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:7; и (ii)  
15 область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:9, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:10. В другом случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID  
20 NO:3, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:7; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:8, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:9, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:10.

15

20

25

В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:30. В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,  
30 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:12. В одном случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:30, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:12. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:30, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:12. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:30, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:12.

30

35

В определенных случаях представленное в данном документе антитело, которое связывается с  $\alpha\beta 1$ , представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью  
40 VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:30, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:12.

40

*Иллюстративное антитело 5*

Иллюстративное антитело 5 специфически связывает  $\alpha\beta 1$  человека, а также связывается с  $\alpha\beta 1$  яванской макаки,  $\alpha\beta 1$  мыши и  $\alpha\beta 1$  крысы. Иллюстративное антитело 5 является интернализированным.

5 Аминокислотные последовательности CDR и зрелых переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи иллюстративного антитела 5 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	YYGMH (SEQ ID NO:31)	FTFKYYGMH (SEQ ID NO:32)
VH CDR2	SIWYDGSNKKYADSVKG (SEQ ID NO:33)	SIWYDGSNKK (SEQ ID NO:34)
VH CDR3	GGPTRGDGTRVYYYYGMDV (SEQ ID NO:17)	GGPTRGDGTRVYYYYGMDV (SEQ ID NO:17)
VL CDR1	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:18)	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:18)
VL CDR2	SASTRAT (SEQ ID NO:19)	SASTRAT (SEQ ID NO:19)
VL CDR3	QQYYHHPFT (SEQ ID NO:20)	QQYYHHPFT (SEQ ID NO:20)

*VH:*

10 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFKYYGMHWVRQAPGKGLEWVASIWYDGSNKKYADSVKGRF  
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPTRGDGTRVYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID  
NO:35)

*VL:*

15 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYSASTRATGIPARFSGSGSGTEFTL  
TISSLQSEDFAVYYCQQYYHHPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:22)

В некоторых случаях антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 5. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGT или по Онеггеру. Указанные CDR могут быть определены, например, с помощью базы данных AbYsis.

20

В одном случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:32, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:34, и

25

область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:20.

5 В другом случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:31, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:33, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:20.

В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:35. В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:22. В одном случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:35, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:22. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:35, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:22. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:35, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:22.

25 В определенных случаях представленное в данном документе антитело, которое связывается с  $\alpha\beta 1$ , представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22.

### 30 *Иллюстративное антитело 6*

Иллюстративное антитело 6 специфически связывает  $\alpha\beta 1$  человека. Аминокислотные последовательности CDR и зрелых переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи иллюстративного антитела 6 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	DYYMS (SEQ ID NO:36)	FTFSDYYMS (SEQ ID NO:37)
VH CDR2	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO:38)	YISSSGSTIY (SEQ ID NO:39)

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR3	GGRNRGDSSLSGIDV (SEQ ID NO:40)	GGRNRGDSSLSGIDV (SEQ ID NO:40)
VL CDR1	RASQSINSYLN (SEQ ID NO:41)	RASQSINSYLN (SEQ ID NO:41)
VL CDR2	AASSLQS (SEQ ID NO:42)	AASSLQS (SEQ ID NO:42)
VL CDR3	QQQYSDIT (SEQ ID NO:43)	QQQYSDIT (SEQ ID NO:43)

*VH:*

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISR  
DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRNRGDSSLSGIDVWVGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:44)

5

*VL:*

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSINSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTL  
TISSLQPEDFATYYCQQQYSDITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:45)

10 В некоторых случаях антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 6. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGТ или по Онеггеру. Указанные CDR могут быть определены, например, с помощью базы данных AbYsis.

15 В одном случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:39, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:40; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в  
20 SEQ ID NO:41, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:43. В другом случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, и  
25 область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:40; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:41, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:43.

30 В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:44. В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$

содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:45. В одном случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:44, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:45. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:44, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:45. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:44, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:45. В определенных случаях представленное в данном документе антитело, которое связывается с  $\alpha\beta 1$ , представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:44, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:45.

#### Иллюстративное антитело 7

Иллюстративное антитело 7 специфически связывает  $\alpha\beta 1$  человека. Аминокислотные последовательности CDR и зрелых вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи иллюстративного антитела 7 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	DYYMS (SEQ ID NO:36)	FTFSDYYMS (SEQ ID NO:37)
VH CDR2	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO:38)	YISSSGSTIY (SEQ ID NO:39)
VH CDR3	GGPSRGDALAEYFQH (SEQ ID NO:46)	GGPSRGDALAEYFQH (SEQ ID NO:46)
VL CDR1	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:18)	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:18)
VL CDR2	GASTRAT (SEQ ID NO:47)	GASTRAT (SEQ ID NO:47)
VL CDR3	QQLVNYPPIT (SEQ ID NO:48)	QQLVNYPPIT (SEQ ID NO:48)

VH:

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISR  
DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPSRGDALAEYFQHWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:49)

VL:

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWAYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTL

TISSLQSEDFAVYYCQQLVNYPPITFGGGTKVEIK

**(SEQ ID NO:50)**

В некоторых случаях антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 7. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGТ или по Онеггеру. Указанные CDR могут быть определены, например, с помощью базы данных AbYsis.

В одном случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:39, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:46; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:47, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:48.

В другом случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:46; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:47, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:48.

В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:49. В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:50. В одном случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:49, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:50. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:49, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:50. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:49, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:50.

В определенных случаях представленное в данном документе антитело, которое связывается с  $\alpha\beta 1$ , представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:49, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:50.

*Иллюстративное антитело 8*

Иллюстративное антитело 8 специфически связывает  $\alpha\beta 1$  человека. Аминокислотные

последовательности CDR и зрелых переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи иллюстративного антитела 8 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	DYSMN (SEQ ID NO:51)	FTFYDYSMN (SEQ ID NO:52)
VH CDR2	YISSSSTIYYADSVKG (SEQ ID NO:53)	YISSSSTIY (SEQ ID NO:54)
VH CDR3	GLWSTEVRYYYMDV (SEQ ID NO:55)	GLWSTEVRYYYMDV (SEQ ID NO:55)
VL CDR1	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:18)	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:18)
VL CDR2	SASTRAT (SEQ ID NO:19)	SASTRAT (SEQ ID NO:19)
VL CDR3	QQSNAWPFT (SEQ ID NO:56)	QQSNAWPFT (SEQ ID NO:56)

5 *VH:*

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYDYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSTIYYADSVKGRFTIS  
RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLWSTEVRYYYMDVWGKGTITVTVSS (SEQ ID NO:57)

*VL:*

10 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYSASTRATGIPARFSGSGSGTEFTL  
TISSLQSEDFAVYYCQQSNAWPFTFGGGTKVEIK  
(SEQ ID NO:58)

15 В некоторых случаях антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 8. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGT или по Онеггеру. Указанные CDR могут быть определены, например, с помощью базы данных AbYsis.

20 В одном случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:52, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:54, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:55; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:56.

25 В другом случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:51, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:53, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:55; и (ii)

область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:56.

В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:57. В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:58. В одном случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:57, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:58. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:57, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:58. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:57, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:58.

В определенных случаях представленное в данном документе антитело, которое связывается с  $\alpha\beta 1$ , представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:57, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:58.

#### *Иллюстративное антитело 9*

Иллюстративное антитело 9 специфически связывает  $\alpha\beta 1$  человека. Аминокислотные последовательности CDR и зрелых вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи иллюстративного антитела 9 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	DYSMH (SEQ ID NO:59)	FTFDDYSMH (SEQ ID NO:60)
VH CDR2	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO:38)	YISSSGSTIY (SEQ ID NO:39)
VH CDR3	GLWSTEVRYYYMDV (SEQ ID NO:55)	GLWSTEVRYYYMDV (SEQ ID NO:55)
VL CDR1	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:18)	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:18)
VL CDR2	SASTRAT (SEQ ID NO:19)	SASTRAT (SEQ ID NO:19)
VL CDR3	QQSNAWPFT (SEQ ID NO:56)	QQSNAWPFT (SEQ ID NO:56)

VH:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYSMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTIS  
RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLWSTEVRYYYMDVWGKGTITVTVSS (SEQ ID NO:61)

VL:

5 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYSASTRATGIPARFSGSGSGTEFTL  
TISSLQSEDAVYYCQQSNAPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:58)

В некоторых случаях антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 9. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGT или по Онеггеру. Указанные CDR могут  
10 быть определены, например, с помощью базы данных AbYsis.

В одном случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:60, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:39, и  
15 область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:55; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:56.

В другом случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:59, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, и  
20 область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:55; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:56.

В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:61. В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,  
30 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:58. В одном случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:61, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:58. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:61, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:58.

В определенных случаях представленное в данном документе антитело, которое связывается с  $\alpha\beta 1$ , представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, и с областью VL, имеющей  
35 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:58. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:61, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:58.

В определенных случаях представленное в данном документе антитело, которое связывается с  $\alpha\beta 1$ , представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, и с областью VL, имеющей  
40 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:58.

аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:58.

*Иллюстративное антитело 10*

5 Иллюстративное антитело 10 специфически связывает  $\alpha\beta 1$  человека. Аминокислотные последовательности CDR и зрелых переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи иллюстративного антитела 10 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	EYSMF (SEQ ID NO:62)	FTFGEYSMF (SEQ ID NO:63)
VH CDR2	YISSSSSTIYYADSVKG (SEQ ID NO:53)	YISSSSSTIY (SEQ ID NO:54)
VH CDR3	GLWSTEVRYYYMDV (SEQ ID NO:55)	GLWSTEVRYYYMDV (SEQ ID NO:55)
VL CDR1	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:18)	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:18)
VL CDR2	SASTRAT (SEQ ID NO:19)	SASTRAT (SEQ ID NO:19)
VL CDR3	QQSNAWPFT (SEQ ID NO:56)	QQSNAWPFT (SEQ ID NO:56)

*VH:*

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGEYSMFVWRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISR  
DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLWSTEVRYYYMDVWGKGTITVTVSS (SEQ ID NO:64)

*VL:*

15 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYSASTRATGIPARFSGSGSGTEFTL  
TISSLQSEDAVYYCQQSNAWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:58)

В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 10. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGT или по Онеггеру. Указанные CDR могут быть определены, например, с помощью базы данных AbYsis.

20 В одном случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:63, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:54, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:55; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID

NO:19, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:56. В другом случае представленное в данном документе антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:62, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:53, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:55; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:19, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:56. В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:64. В некоторых случаях указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:58. В одном случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:64, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:58. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:64, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:58. В другом случае указанное антитело против  $\alpha\beta 1$  содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:64, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:58. В определенных случаях представленное в данном документе антитело, которое связывается с  $\alpha\beta 1$ , представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:64, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:58.

**В. Группа II (антитела, которые связываются как с интегрином  $\alpha\beta 1$ , так и с интегрином  $\alpha\beta 6$ , но не с другими интегринными)**

В данном документе также представлены антитела, которые связываются как с интегрином  $\alpha\beta 1$ , так и с интегрином  $\alpha\beta 6$ . В некоторых случаях указанные антитела не связываются с другими интегринными. В некоторых случаях указанные антитела не связываются с другими RGD-связывающими интегринными (например, интегринными  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha IIb\beta 3$ ), кроме интегринов  $\alpha\beta 1$  и  $\alpha\beta 6$ . Все антитела из группы II связываются с интегрином  $\alpha\beta 1$  человека и с интегрином  $\alpha\beta 6$  человека. Такие антитела включают в себя последовательности иллюстративных антител 11-14, которые связываются с высокой аффинностью, характеризующейся показателем  $KD \leq 20$  нм (бивалентная аффинность), с  $\alpha\beta 1$  человека, и с аффинностью в 100 нм (бивалентная аффинность) с  $\alpha\beta 6$  человека.

*Иллюстративное антитело 11*

Иллюстративное антитело 11 специфически связывается с  $\alpha\beta 1$  человека и с  $\alpha\beta 6$  человека, но не с другими интегринными (например, другим семейством RGD-интегринов). Аминокислотные последовательности CDR и зрелых переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой

цепи иллюстративного антитела 11 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	DYYMS (SEQ ID NO:36)	FTFSDYYMS (SEQ ID NO:37)
VH CDR2	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO:38)	YISSSGSTIY (SEQ ID NO:39)
VH CDR3	GGRNRGDSSLSGIDV (SEQ ID NO:40)	GGRNRGDSSLSGIDV (SEQ ID NO:40)
VL CDR1	RASQSISSYLN (SEQ ID NO:65)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO:65)
VL CDR2	GASSLQS (SEQ ID NO:66)	GASSLQS (SEQ ID NO:66)
VL CDR3	QQQYDDIT (SEQ ID NO:67)	QQQYDDIT (SEQ ID NO:67)

*VH:*

5 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISR  
DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRNRGDSSLSGIDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:44)

*VL:*

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL  
TISSLQPEDFATYYCQQQYDDITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:68)

10 В некоторых случаях указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 11. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGT или по Онеггеру. Указанные CDR могут быть определены, например, с помощью  
15 базы данных AbYsis.

В одном случае антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:39, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:40;  
20 и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:65, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:66, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:67. В другом случае антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность,  
25 указанную в SEQ ID NO:36, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:40; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную

последовательность, указанную в SEQ ID NO:65, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:66, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:67.

5 В некоторых случаях антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:44. В некоторых случаях указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:68. В одном случае указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:44, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:68. В другом случае указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:44, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:68. В другом случае указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:44, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:68.

20 В определенных случаях представленное в данном документе антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:44, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:68.

#### 25 *Иллюстративное антитело 12*

Иллюстративное антитело 12 специфически связывается с  $\alpha\beta 1$  человека и с  $\alpha\beta 6$  человека, но не с другими интегринными (например, другим семейством RGD-интегринов). Аминокислотные последовательности CDR и зрелых переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи иллюстративного антитела 12 представлены ниже.

30

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	DYYMS (SEQ ID NO:36)	FTFSDYYMS (SEQ ID NO:37)
VH CDR2	YISSSGSTIYADSVKG (SEQ ID NO:38)	YISSSGSTIY (SEQ ID NO:39)
VH CDR3	GGRNRGDSSLSGIDV (SEQ ID NO:40)	GGRNRGDSSLSGIDV (SEQ ID NO:40)
VL CDR1	RASQSISSYLN (SEQ ID NO:65)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO:65)

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VL CDR2	GASSLQS (SEQ ID NO:66)	GASSLQS (SEQ ID NO:66)
VL CDR3	QQQYIDIT (SEQ ID NO:69)	QQQYIDIT (SEQ ID NO:69)

VH:

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISR  
DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRNRGDSLSLGDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:44)

5

VL:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL  
TISSLQPEDFATYYCQQQYIDITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:70)

10 В некоторых случаях указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 12. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGT или по Онеггеру.

15 В одном случае антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:39, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:40; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:65, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:66, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:69. В другом случае антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:40; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:65, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:66, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:69.

30 В некоторых случаях антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:44. В некоторых случаях указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:70. В одном случае указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:44, и область

35

VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:70. В другом случае указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:44, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:70. В другом случае указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:44, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:70.

В определенных случаях представленное в данном документе антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:44, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:70.

### Иллюстративное антитело 13

Иллюстративное антитело 13 специфически связывается с  $\alpha\beta 1$  человека и с  $\alpha\beta 6$  человека, но не с другими интегринами (например, другим семейством RGD-интегринов). Аминокислотные последовательности CDR и зрелых переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи иллюстративного антитела 13 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	DYYMS (SEQ ID NO:36)	FTFSDYYMS (SEQ ID NO:37)
VH CDR2	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO:38)	YISSSGSTIY (SEQ ID NO:39)
VH CDR3	GGPSRGDALAEYFQH (SEQ ID NO:46)	GGPSRGDALAEYFQH (SEQ ID NO:46)
VL CDR1	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:18)	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:18)
VL CDR2	GASTRAT (SEQ ID NO:47)	GASTRAT (SEQ ID NO:47)
VL CDR3	QQLTNHPPIA (SEQ ID NO:71)	QQLTNHPPIA (SEQ ID NO:71)

VH:

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISR  
DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPSRGDALAEYFQHWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:49)

VL:

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTL  
TISSLQSEDFAVYYCQQLTNHPPIAFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:72)

В некоторых случаях указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного

антитела 13. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IМGT или по Онеггеру.

В одном случае антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:39, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:46; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:47, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:71. В другом случае указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:46; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:18, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:47, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:71.

В некоторых случаях антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:49. В некоторых случаях указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:72. В одном случае указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:49, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:72. В другом случае указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:49, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:72. В другом случае указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:49, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:72.

В определенных случаях представленное в данном документе антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:49, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:72.

#### *Иллюстративное антитело 14*

Иллюстративное антитело 14 специфически связывается с  $\alpha\beta 1$  человека и с  $\alpha\beta 6$  человека, но не с

другими интегринами (например, другим семейством RGD-интегринов). Аминокислотные последовательности CDR и зрелых вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи иллюстративного антитела 14 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	DYYMS (SEQ ID NO:36)	FTFSDYYMS (SEQ ID NO:37)
VH CDR2	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO:38)	YISSSGSTIY (SEQ ID NO:39)
VH CDR3	ERGNRGDTPRYYYMDV (SEQ ID NO:73)	ERGNRGDTPRYYYMDV (SEQ ID NO:73)
VL CDR1	RASQISRYLN (SEQ ID NO:74)	RASQISRYLN (SEQ ID NO:74)
VL CDR2	AASSLQS (SEQ ID NO:42)	AASSLQS (SEQ ID NO:42)
VL CDR3	QQLVTPFT (SEQ ID NO:75)	QQLVTPFT (SEQ ID NO:75)

5

*VH:*

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISR  
DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERGNRGDTPRYYYMDVWVGKGTTVTVSS (SEQ ID NO:76)

*VL:*

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL  
TISSLQPEDFATYYCQQLVTPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:77)

В некоторых случаях указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 14. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области  
15 техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGT или по Онеггеру.

В одном случае антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID  
20 NO:39, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:74, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:75. В другом случае указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$   
25 человека, содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:73; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1,

содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:74, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:42, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:75.

5 В некоторых случаях антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:76. В некоторых случаях указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:77. В одном случае указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:76, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:77. В другом случае указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:76, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:77. В другом случае указанное антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:76, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:77.

10 В определенных случаях представленное в данном документе антитело, которое связывается как с  $\alpha\beta 1$  человека, так и с  $\alpha\beta 6$  человека, представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:76, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:77.

15

20

25 *C. Группа III (антитела, которые связываются с интегрином  $\alpha\beta 1$  и с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из интегринов  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 11\beta 3$ )*

В данном документе также представлены антитела, которые связываются с интегрином  $\alpha\beta 1$  и с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 11\beta 3$ . В некоторых случаях указанные антитела не связываются с интегринными, кроме RGD-связывающих интегринов. Такие антитела включают в себя последовательности иллюстративных антител 15-20, которые связываются с высокой аффинностью, характеризующейся показателем  $KD \leq 20$  нМ (бивалентная аффинность), с  $\alpha\beta 1$  человека, и с аффинностью в 100 нМ (бивалентная аффинность) с другими RGD-связывающими интегринными.

30

35

#### *Иллюстративное антитело 15*

Иллюстративное антитело 15 специфически связывается с  $\alpha\beta 1$  человека и по меньшей мере с одним (например, одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или семью) другим интегрином семейства RGD (например,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 11\beta 3$ ). Данное антитело проявляет не зависящее от катионов связывание со своей целью. Аминокислотные последовательности CDR и зрелых переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи иллюстративного антитела 15 представлены ниже.

40

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	SYVMH (SEQ ID NO:3)	YTFTSYVMH (SEQ ID NO:4)
VH CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:5)	IINPSGGSTS (SEQ ID NO:6)
VH CDR3	DRSGIAGRWRVYYYGMDV (SEQ ID NO:78)	DRSGIAGRWRVYYYGMDV (SEQ ID NO:78)
VL CDR1	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:79)	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:79)
VL CDR2	DASNRAT (SEQ ID NO:80)	DASNRAT (SEQ ID NO:80)
VL CDR3	QQRSNLPYT (SEQ ID NO:81)	QQRSNLPYT (SEQ ID NO:81)

VH:

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVT  
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDRSGIAGRWRVYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:82)

VL:

10 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTL  
TISSLEPEDFAVYYCQQRSNLPYTFGGGTKVEIK  
(SEQ ID NO:83)

15 В некоторых случаях антитело из группы III (т. е. антитело, которое связывается с интегрином  $\alpha\beta 1$  и с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 1\beta 3$ ) содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 15. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGT или по Онеггеру.

20 В одном случае представленное антитело из группы III содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:4, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:78; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:79, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:80, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:81. В другом случае антитело из группы III содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:3, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:78; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:79, область VLCDR2,

содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:80, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:81.

В некоторых случаях антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:82. В некоторых случаях антитело из группы III содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:83. В одном случае антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:82, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:83. В другом случае антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:82, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:83. В другом случае антитело из группы III содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:82, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:83.

В определенных случаях антитело из группы III представляет собой антитело, которое конкурирует или связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:82, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:83.

#### *Иллюстративное антитело 16*

Иллюстративное антитело 16 специфически связывается с  $\alpha\beta 1$  человека и по меньшей мере с одним (например, одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или семью) другим интегрином семейства RGD (например,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 1\text{IB}\beta 3$ ). Аминокислотные последовательности CDR и зрелых переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи иллюстративного антитела 16 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	SYWIG (SEQ ID NO:84)	YSFTSYWIG (SEQ ID NO:85)
VH CDR2	IIYPGDS DTRYSPFQG (SEQ ID NO:86)	IIYPGDS DTR (SEQ ID NO:87)
VH CDR3	GPRSRGDGPSNYYYMDV (SEQ ID NO:88)	GPRSRGDGPSNYYYMDV (SEQ ID NO:88)
VL CDR1	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:89)	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:89)
VL CDR2	KASSLES (SEQ ID NO:90)	KASSLES (SEQ ID NO:90)
VL CDR3	QQYHSFSFT (SEQ ID NO:91)	QQYHSFSFT (SEQ ID NO:91)

VH:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPGDS DTRYSPSFQGGVTTIS  
ADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGPRSRGDGPSNYYYMDVWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:92)

VL:

5 DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQOKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL  
TISSLQPDDFATYYCQQYHFSFSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:93)

В некоторых случаях антитело из группы III (т. е. антитело, которое связывается с интегрином  $\alpha\beta 1$  и с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 1\beta 3$ ) содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 16. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGT или по Онегеру.

В одном случае представленное антитело из группы III содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:85, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:87, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:88; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:89, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:90, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91. В другом случае антитело из группы III содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:84, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:86, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:88; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:89, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:90, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:91.

В некоторых случаях антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:92. В некоторых случаях антитело из группы III содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:93. В одном случае антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:92, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:93. В другом случае антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:92, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:93. В другом случае антитело из группы III содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:92, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:93.

В определенных случаях антитело из группы III представляет собой антитело, которое конкурирует или

связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:92, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:93.

5 *Иллюстративное антитело 17*

Иллюстративное антитело 17 специфически связывается с  $\alpha\beta 1$  человека и по меньшей мере с одним (например, одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или семью) другим интегрином семейства RGD (например,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 11\beta 3$ ). Иллюстративное антитело 17 также связывается с  $\alpha\beta 1$  яванской макаки,  $\alpha\beta 1$  мыши и  $\alpha\beta 1$  крысы. Иллюстративное антитело 17 является интернализированным. В некоторых случаях указанное антитело специфически связывается с  $\alpha\beta 1$  и  $\alpha\beta 3$ . Аминокислотные последовательности CDR и зрелых переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи иллюстративного антитела 17 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	SYWIG (SEQ ID NO:84)	YSFTSYWIG (SEQ ID NO:85)
VH CDR2	IIYPGDS DTRYSPFQG (SEQ ID NO:86)	IIYPGDS DTR (SEQ ID NO:87)
VH CDR3	GPRSRGDGPSNYYYMDV (SEQ ID NO:88)	GPRSRGDGPSNYYYMDV (SEQ ID NO:88)
VL CDR1	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:89)	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:89)
VL CDR2	KASSLES (SEQ ID NO:90)	KASSLES (SEQ ID NO:90)
VL CDR3	QQYRPLPPT (SEQ ID NO:94)	QQYRPLPPT (SEQ ID NO:94)

15 *VH:*

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPFQQQVTIS  
ADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGPRSRGDGPSNYYYMDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:92)

*VL:*

20 DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL  
TISSLQPDDFATYYCQQYRPLPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:95)

В некоторых случаях антитело из группы III (т. е. антитело, которое связывается с интегрином  $\alpha\beta 1$  и с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 11\beta 3$ ) содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 17. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGT или по Онеггеру.

В одном случае представленное антитело из группы III содержит: (i) область VH, содержащую область

VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:85, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:87, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:88; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:89, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:90, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:94. В другом случае антитело из группы III содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:84, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:86, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:88; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:89, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:90, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:94.

В некоторых случаях антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:92. В некоторых случаях антитело из группы III содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:95. В одном случае антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:92, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:95. В другом случае антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:92, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:95. В другом случае антитело из группы III содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:92, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:95.

В определенных случаях антитело из группы III представляет собой антитело, которое конкурирует или связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:92, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:95.

#### *Иллюстративное антитело 18*

Иллюстративное антитело 18 специфически связывается с  $\alpha\beta 1$  человека и по меньшей мере с одним (например, одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или семью) другим интегрином семейства RGD (например,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 11\beta 3$ ). В некоторых случаях указанное антитело связывает  $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$  и  $\alpha\beta 8$ . Данное антитело проявляет не зависящее от катионов связывание со своей целью. Аминокислотные последовательности CDR и зрелых переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи иллюстративного антитела 18 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	SFYMH	YTFRSFYMH

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
	(SEQ ID NO:96)	(SEQ ID NO:97)
VH CDR2	VINPSLGSTGYAQKFQG (SEQ ID NO:98)	VINPSLGSTG (SEQ ID NO:99)
VH CDR3	ETNYRGGPAFDI (SEQ ID NO:23)	ETNYRGGPAFDI (SEQ ID NO:23)
VL CDR1	RSSQSLLSNGYNYLD (SEQ ID NO:24)	RSSQSLLSNGYNYLD (SEQ ID NO:24)
VL CDR2	LGSNRAS (SEQ ID NO:25)	LGSNRAS (SEQ ID NO:25)
VL CDR3	MQVLGTPPWT (SEQ ID NO:26)	MQVLGTPPWT (SEQ ID NO:26)

VH:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFRSFYMHWRQAPGQGLEWMGVINPSLGSTGYAQKFQGRV  
 TMRDSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARETNYRGGPAFDIWGQGTMTVSS (SEQ ID NO:100)

5 VL:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSG  
 TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQVLGTPPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:28)

В некоторых случаях антитело из группы III (т. е. антитело, которое связывается с интегрином  $\alpha\nu\beta 1$  и с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ ,  $\alpha\nu\beta 6$ ,  $\alpha\nu\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 11\beta 3$ ) содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 18. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGT или по Онеггеру.

В одном случае представленное антитело из группы III содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:97, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:99, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:23; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:26. В другом случае антитело из группы III содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:96, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:98, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:23; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:26.

В некоторых случаях антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной

последовательности, указанной в SEQ ID NO:100. В некоторых случаях антитело из группы III содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:28. В одном случае антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:100, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:28. В другом случае антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:100, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:28. В другом случае антитело из группы III содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:100, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:28.

В определенных случаях антитело из группы III представляет собой антитело, которое конкурирует или связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:100, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:28.

#### *Иллюстративное антитело 19*

Иллюстративное антитело 19 специфически связывается с  $\alpha\beta 1$  человека и по меньшей мере с одним (например, одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или семью) другим интегрином семейства RGD (например,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 11\beta 3$ ). Иллюстративное антитело 19 также связывается с  $\alpha\beta 1$  яванской макаки,  $\alpha\beta 1$  мыши и  $\alpha\beta 1$  крысы. Иллюстративное антитело 19 является интернализированным. В некоторых случаях указанное антитело специфически связывается с  $\alpha\beta 1$  и  $\alpha\beta 8$ . Аминокислотные последовательности CDR и зрелых переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи иллюстративного антитела 19 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	SYGMH (SEQ ID NO:13)	FTFSSYGMH (SEQ ID NO:14)
VH CDR2	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:15)	VISYDGSNKY (SEQ ID NO:16)
VH CDR3	GGPTRGDGTRVYYYGMDV (SEQ ID NO:17)	GGPTRGDGTRVYYYGMDV (SEQ ID NO:17)
VL CDR1	KSSQSVLYSSNNKNYLA (SEQ ID NO:101)	KSSQSVLYSSNNKNYLA (SEQ ID NO:101)
VL CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:102)	WASTRES (SEQ ID NO:102)
VL CDR3	QQYVAFPRT (SEQ ID NO:103)	QQYVAFPRT (SEQ ID NO:103)

*VH:*

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFT

ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPTRGDGTRVYYYYGMDVWVGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:21)

VL:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPELLIYWASTRESGVPDRFSGS  
GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYVAFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:104)

5 В некоторых случаях антитело из группы III (т. е. антитело, которое связывается с интегрином  $\alpha\beta 1$  и с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 1\beta 3$ ) содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR иллюстративного антитела 19. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа,  
10 по уточненному Чотиа, по контакту, IMGT или по Онеггеру.

В одном случае представленное антитело из группы III содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:14, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:16, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17; и (ii) область VL,  
15 содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:101, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:102, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:103. В другом случае антитело из группы III содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:15, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:17; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:101, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:102, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:103.

25 В некоторых случаях антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:21. В некоторых случаях антитело из группы III содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:104. В одном случае  
30 антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:21, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:104. В другом случае антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:21, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:104. В другом случае антитело из группы III содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:21, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:104.

В определенных случаях антитело из группы III представляет собой антитело, которое конкурирует или связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:104.

*Иллюстративное антитело 20*

Иллюстративное антитело 20 специфически связывается с  $\alpha\beta 1$  человека и по меньшей мере с одним (например, одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или семью) другим интегрином семейства RGD (например,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 11\beta 3$ ). Аминокислотные последовательности CDR и зрелых 5 варьируемых областей тяжелой цепи и варьируемых областей легкой цепи иллюстративного антитела 20 представлены ниже.

Домен	Кабат	Уточненный Чотиа/AbM
VH CDR1	DYYMS (SEQ ID NO:36)	FTFSDYYMS (SEQ ID NO:37)
VH CDR2	YISSSGSTIYYADSVKG (SEQ ID NO:38)	YISSSGSTIY (SEQ ID NO:39)
VH CDR3	GGPSRGDALAEYFQH (SEQ ID NO:46)	GGPSRGDALAEYFQH (SEQ ID NO:46)
VL CDR1	RASQSVSRILA (SEQ ID NO:105)	RASQSVSRILA (SEQ ID NO:105)
VL CDR2	DASNRAT (SEQ ID NO:80)	DASNRAT (SEQ ID NO:80)
VL CDR3	QQLSLHPPYT (SEQ ID NO:106)	QQLSLHPPYT (SEQ ID NO:106)

10 *VH:*

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISR  
DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPSRGDALAEYFQHWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:49)

*VL:*

15 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRILAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTL  
TISSLEPEDFAVYYCQQLSLHPPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:107)

В некоторых случаях антитело из группы III (т. е. антитело, которое связывается с интегрином  $\alpha\beta 1$  и с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 11\beta 3$ ) содержит область VH, содержащую три VH CDR, и область VL, содержащую три VL CDR 20 иллюстративного антитела 20. Данные шесть CDR могут быть основаны на любом определении, известном в данной области техники, таком как следующие определения, но не ограничиваясь ими: по Кабату, по Чотиа, по уточненному Чотиа, по контакту, IMGT или по Онеггеру.

В одном случае представленное антитело из группы III содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, область VHCDR2, 25 содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:39, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:46; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:105, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:80, и

область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:106. В другом случае антитело из группы III содержит: (i) область VH, содержащую область VHCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, область VHCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, и область VHCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:46; и (ii) область VL, содержащую область VLCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:105, область VLCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:80, и область VLCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:106.

В некоторых случаях антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:49. В некоторых случаях антитело из группы III содержит область VL, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:107. В одном случае антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:49, и область VL, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:107. В другом случае антитело из группы III содержит область VH, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:49, и область VL, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:107. В другом случае антитело из группы III содержит область VH, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:49, и область VL, которая идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:107.

В определенных случаях антитело из группы III представляет собой антитело, которое конкурирует или связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело с областью VH, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:49, и с областью VL, имеющей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:107.

#### *Фрагменты антител*

Фрагменты антител (например, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc и Fv) могут быть получены путем протеолитического расщепления интактных антител. Например, фрагменты антител могут быть получены путем обработки полноразмерного антитела ферментом, таким как папаин, пепсин или плазмин. Расщепление полноразмерных антител папаином приводит к образованию фрагментов F(ab)<sub>2</sub> или Fab; расщепление полноразмерных антител пепсином приводит к образованию F(ab')<sub>2</sub> или Fab'; и расщепление полноразмерных антител плазмином приводит к образованию фрагментов Fabc.

В качестве альтернативы фрагменты антител могут быть получены рекомбинантными способами. Например, нуклеиновые кислоты, которые кодируют представляющие интерес фрагменты антител, могут быть сконструированы, введены в вектор экспрессии и экспрессированы в подходящих клетках-хозяевах. См., например, Co, M.S. et al., *J. Immunol.*, 152: 2968-2976 (1994); Better, M. and Horwitz, A.H., *Methods in Enzymology*, 178: 476-496 (1989); Pluckthun, A. and Skerra, A., *Methods in Enzymology*, 178: 476-496 (1989); Lamoyi, E., *Methods in Enzymology*, 121: 652-663 (1989); Rousseaux, J. et al., *Methods in Enzymology*, (1989) 121: 663-669 (1989); и Bird, R.E. et al., *TIBTECH*, 9: 132-137 (1991)). Фрагменты антител могут экспрессироваться и секретироваться из *E. coli*, позволяя тем самым легко продуцировать большие количества указанных

фрагментов. Фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител. В качестве альтернативы фрагменты Fab'-SH можно выделять непосредственно из *E. coli* и химически связывать с образованием фрагментов F(ab')<sub>2</sub> (Carter et al., *Bio/Technology*, 10: 163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом фрагменты F(ab')<sub>2</sub> можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев.

5 Фрагменты Fab и F(ab')<sub>2</sub> с повышенным временем полужизни *in vivo*, содержащие остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации, описаны в патенте США № 5869046.

#### Миниантитела

Миниантитела любого из антител, описанных в данном документе, включают в себя диатела, одноцепочечные (scFv) и одноцепочечные (Fv)<sub>2</sub> (sc(Fv)<sub>2</sub>). В некоторых случаях миниантитело слито с Fc человека или с доменом CH3 Fc человека. Например, scFv или sc(Fv)<sub>2</sub>, который связывает αvβ1 или αvβ1 и αvβ6, может быть слит с Fc IgG1 человека или с доменом CH3 IgG1 человека. Указанные домены могут быть модифицированы для снижения эффекторной функции. Указанные домены могут быть модифицированы для уменьшения или предотвращения посттрансляционных модификаций (например, гликозилирования).

15 «Диатело» представляет собой бивалентное миниантитело, сконструированное путем слияния генов (см., например, Holliger, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 6444-6448 (1993); EP 404,097; WO 93/11161). Диатела представляют собой димеры, состоящие из двух полипептидных цепей. Домены VL и VH каждой полипептидной цепи диатела связаны линкерами. Число аминокислотных остатков, составляющих линкер, может составлять от 2 до 12 остатков (например, 3-10 остатков, или пять, или около пяти остатков). Линкеры

20 полипептидов в диателе, как правило, слишком короткие, чтобы позволить VL и VH связываться друг с другом. Таким образом, VL и VH, кодируемые в одной и той же полипептидной цепи, не могут образовывать одноцепочечный фрагмент варибельной области, а вместо этого образуют димер с другим одноцепочечным фрагментом варибельной области. В результате этого диатело имеет два антигенсвязывающих сайта.

scFv представляет собой одноцепочечное полипептидное антитело, полученное путем сшивания VH и VL с помощью линкера (см., например, Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85: 5879-5883 (1988); и Pluckthun, "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113, Ed Resenbug and Moore, Springer Verlag, New York, pp. 269-315, (1994)). Порядок соединения VH и VL особенно не ограничен, и они могут быть расположены в любом порядке. Примеры их расположения включают в себя: [VH] линкер [VL]; или [VL] линкер [VH]. V-область N-цепи и V-область L-цепи в scFv могут быть получены из любого антитела против интегрина,

30 описанного в данном документе (например, иллюстративного антитела 1-20).

sc(Fv)<sub>2</sub> представляет собой миниантитело, в котором две области VH и две области VL связаны линкером, образуя единую цепь (Hudson, et al., *J. Immunol. Methods*, (1999) 231: 177-189 (1999)). sc(Fv)<sub>2</sub> может быть изготовлен, например, путем соединения нескольких scFv с помощью линкера. sc(Fv)<sub>2</sub> согласно данному изобретению включают в себя антитела, в которых, предпочтительно, две области VH и две области VL

35 расположены в следующем порядке: VH, VL, VH и VL ([VH] линкер [VL] линкер [VH] линкер [VL]), начиная с N-конца одноцепочечного полипептида; однако порядок указанных двух областей VH и двух областей VL не ограничивается вышеуказанным расположением, и они могут быть расположены в любом порядке. Примеры расположений перечислены ниже:

[VL] линкер [VH] линкер [VH] линкер [VL]

40 [VH] линкер [VL] линкер [VL] линкер [VH]

[VH] линкер [VH] линкер [VL] линкер [VL]

[VL] линкер [VL] линкер [VH] линкер [VH]

[VL] линкер [VH] линкер [VL] линкер [VH]

Обычно требуется три линкера, когда связываются четыре переменные области антител; используемые линкеры могут быть одинаковыми или разными. Нет никаких особых ограничений относительно линкеров, которые связывают области VH и VL миниантител. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер. Любой произвольный одноцепочечный пептид, содержащий от трех до 25 остатков (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18) может использоваться в качестве линкера. Примеры таких пептидных линкеров включают в себя: Ser; Gly Ser; Gly Gly Ser; Ser Gly Gly; Gly Gly Gly Ser (**SEQ ID NO:108**); Ser Gly Gly Gly (**SEQ ID NO:109**); Gly Gly Gly Gly Ser (**SEQ ID NO:110**); Ser Gly Gly Gly Gly (**SEQ ID NO:111**); Gly Gly Gly Gly Gly Ser (**SEQ ID NO:112**); Ser Gly Gly Gly Gly Gly (**SEQ ID NO:113**); Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser (**SEQ ID NO:114**); Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly (**SEQ ID NO:115**); (Gly Gly Gly Gly Ser)<sub>n</sub> (**SEQ ID NO:110**)<sub>n</sub>, где n представляет собой целое число, равное единице или большее, чем единица; и (Ser Gly Gly Gly Gly)<sub>n</sub> (**SEQ ID NO:111**)<sub>n</sub>, где n представляет собой целое число, равное единице или большее, чем единица.

В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой линкер – синтетическое соединение (химический поперечно сшивающий агент). Примеры поперечно сшивающих агентов, которые доступны в продаже, включают в себя N-гидроксисукцинимид (NHS), дисукцинимидилсуберат (DSS), бис(сульфосукцинимидил)суберат (BS3), дитиобис(сукцинимидилпропионат) (DSP), дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP), этиленгликоль бис(сукцинимидилсукцинат) (EGS), этиленгликоль бис(сульфосукцинимидилсукцинат) (сульфо-EGS), дисукцинимидил тартрат (DST), дисульфосукцинимидил тартрат (сульфо-DST), бис[2-(сукцинимидоксикарбонилокси)этил]сульфон (BSOCOES) и бис[2-(сульфосукцинимидоксикарбонилокси)этил]сульфон (сульфо-BSOCOES).

Аминокислотная последовательность VH или VL в миниантителах может включать в себя модификации, такие как замены, удаления, добавления и/или вставки. Например, модификация может быть расположена в одной или большем числе каркасных областей антител, описанных в данном документе (например, иллюстративных антител 1-20). В определенных вариантах осуществления модификация включает в себя одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать аминокислотных замен в одной или большем числе каркасных областей домена VH и/или домена VL миниантитела. Такие замены производятся для улучшения связывания и/или функциональной активности миниантитела. В других вариантах осуществления одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать аминокислот из FR в антителах, описанных в данном документе, могут быть удалены или добавлены, пока сохраняется связывание с  $\alpha\beta 1$  (и связывание с  $\alpha\beta 6$ , или связывание с одним или большим числом из  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 1\beta 3$ ), и/или пока сохраняется функциональная активность, когда VH и VL связаны.

#### *Биспецифические и полиспецифические антитела*

Полиспецифические антитела представляют собой антитела, обладающие специфичностью связывания в отношении двух или большего числа различных эпитопов. Биспецифические антитела представляют собой антитела, обладающие специфичностью связывания в отношении двух различных эпитопов одного антигена

или двух различных антигенов. Иллюстративные биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами белка  $\alpha\beta 1$ . Другие такие антитела могут сочетать сайт связывания  $\alpha\beta 1$  с сайтом связывания другого белка (например,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 3$ ). В некоторых случаях биспецифическое антитело содержит первую область VH и первую область VL, которые специфически связываются с  $\alpha\beta 1$ , и вторую область VH и вторую область VL, которые специфически связываются с  $\alpha\beta 6$ . В других случаях биспецифическое антитело содержит первую область VH и первую область VL, которые специфически связываются с  $\alpha\beta 1$ , и вторую область VH и вторую область VL, которые специфически связываются как с  $\alpha\beta 1$ , так и с  $\alpha\beta 6$ . В некоторых случаях биспецифическое антитело содержит первую область VH и первую область VL, которые специфически связываются с  $\alpha\beta 1$ , и вторую область VH и вторую область VL, которые специфически связываются с одним или большим числом из следующих:  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 1\beta 3$ . В некоторых случаях биспецифическое антитело содержит первую область VH и первую область VL, которые специфически связываются как с  $\alpha\beta 1$ , так и с  $\alpha\beta 6$ , и вторую область VH и вторую область VL, которые специфически связываются с одним или большим числом из следующих:  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 1\beta 3$ . Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или их низкомолекулярных форм (например, биспецифические антитела  $F(ab')_2$ , биспецифические антитела scFv, биспецифические антитела  $sc(Fv)_2$ , биспецифические антитела-диатела).

Традиционное получение полноразмерных биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар тяжелая цепь иммуноглобулина – легкая цепь иммуноглобулина, где две указанные цепи имеют различные специфичности (Millstein et al., *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Согласно другому подходу переменные домены антитела с желательными специфичностями связывания сливаются с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. ДНК, кодирующие слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, если желательно, легкую цепь иммуноглобулина, вставляют в отдельные векторы экспрессии и котрансфицируют в подходящий организм-хозяин. Это обеспечивает повышенную гибкость в регулировании соотношений данных трех полипептидных фрагментов. Тем не менее, возможно вставить кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один вектор экспрессии, когда экспрессия по меньшей мере двух указанных полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высоким выходам.

Согласно другому подходу, описанному в патенте США № 5731168, граница взаимодействия между парой молекул антител может быть сконструирована так, чтобы максимально увеличить процентное содержание гетеродимеров, извлекаемых из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительная граница взаимодействия содержит по меньшей мере часть домена  $C_{H3}$ . В данном способе одна или большее число малых боковых цепей аминокислот от границы взаимодействия первой молекулы антитела заменяются более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). Компенсирующие «впадины» идентичного или сходного с большой (-ими) боковой (-ыми) цепью (цепями) размера создаются на границе взаимодействия второй молекулы антитела путем замены больших боковых цепей аминокислот на более мелкие (например, аланин или треонин). Это обеспечивает механизм увеличения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Способы создания биспецифических антител хорошо известны в данной области техники. См., например, Spasevska I, Duong MN, Klein C, Dumontet C (2015) *Advances in Bispecific Antibodies Engineering: Novel Concepts for Immunotherapies. J Blood Disord Transfus* 6: 243. Doi: 10.4172/2155-9864.1000243; и Husain, B. & Ellerman, D. *BioDrugs* (2018) 32: 441. doi.org/10.1007/s40259-018-0299-9.

Биспецифические антитела включают в себя поперечно сшитые «гетероконъюгированные» антитела.

Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, другое – с биотином. Гетероконъюгированные антитела можно получить с использованием любых удобных способов поперечного сшивания.

Технология «диатела» обеспечивает альтернативный механизм получения биспецифических фрагментов антител. Указанные фрагменты содержат домен VH, соединенный с доменом VL с помощью линкера, который имеет слишком малую длину для образования пары между двумя указанными доменами в одной цепи. Соответственно, домены VH и VL одного фрагмента вынуждены соединяться с комплементарными доменами VL и VH другого фрагмента, тем самым образуя два антигенсвязывающих сайта.

#### *Поливалентные антитела*

Поливалентное антитело может быть интернализировано (и/или катаболизировано) клеткой, экспрессирующей антиген, с которым связываются антитела (например,  $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 1$  и  $\alpha\beta 6$ ), быстрее, чем бивалентное антитело. Любые из описанных в данном документе антител могут быть поливалентными антителами с тремя или большим числом антигенсвязывающих сайтов (например, четырехвалентными антителами), которые могут быть легко получены путем рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи данного антитела. Описанные в данном документе антитела могут содержать домен димеризации и три или большее число антигенсвязывающих сайтов. Иллюстративный домен димеризации содержит (или состоит из) область Fc или шарнирную область. Описанные в данном документе антитела могут содержать (или состоять из) от трех до около восьми (например, четырех) антигенсвязывающих сайтов. Необязательно, поливалентное антитело содержит по меньшей мере одну полипептидную цепь (например, по меньшей мере две полипептидные цепи), при этом указанная (-ые) полипептидная (-ые) цепь (цепи) содержит (-ат) два или большее число переменных доменов. Например, полипептидная (-ые) цепь (цепи) может (могут) содержать  $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ , где VD1 представляет собой первый переменный домен, VD2 представляет собой второй переменный домен, Fc представляет собой полипептидную цепь области Fc, X1 и X2 представляют собой аминокислотный или полипептидный спейсер, а n равно 0 или 1.

#### *Конъюгированные антитела*

Описанные в данном документе антитела могут быть конъюгированными антителами, которые связаны с различными молекулами, включая высокомолекулярные соединения, такие как полимеры (например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), ПЭГ-модифицированный полиэтиленмин (ПЭИ) (ПЭИ-ПЭГ), полиглутаминовая кислота (ПГК) (сополимеры N-(2-гидроксипропил)метакриламида (HPMA)), гиалуроновую кислоту, радиоактивные материалы (например,  $^{90}Y$ ,  $^{131}I$ ), флуоресцентные соединения, люминесцентные соединения, гаптены, ферменты, хелаты металлов и лекарственные средства.

В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела модифицированы фрагментом, который улучшает их стабилизацию и/или удержание в циркуляции, например, в крови, сыворотке крови или других тканях, например, по меньшей мере, в 1,5, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 или 50 раз. Например, описанные в данном документе антитела могут быть связаны (например, конъюгированы) с полимером, например, с по существу неантигенным полимером, таким как полиалкиленоксид или полиэтиленоксид. Подходящие полимеры существенно различаются по весу. Могут быть использованы полимеры, имеющие средние молекулярные массы в диапазоне от около 200 до около 35000 Дальтон (или от

около 1000 до около 15000 и от около 2000 до около 12500). Например, описанные в данном документе антитела могут быть конъюгированы с водорастворимым полимером, например, гидрофильным поливиниловым полимером, например, поливиниловым спиртом или поливинилпирролидоном. Примеры таких полимеров включают в себя гомополимеры полиалкиленоксида, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ) или полипропиленгликоли, полиоксиэтилированные полиолы, их сополимеры и их блок-сополимеры, при условии, что сохраняется растворимость блок-сополимеров в воде. Дополнительные пригодные полимеры включают в себя полиоксиалкилены, такие как полиоксиэтилен, полиоксипропилен и блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена; полиметакрилаты; карбомеры; и разветвленные или неразветвленные полисахариды.

Описанные выше конъюгированные антитела могут быть получены путем выполнения химических модификаций антител или их низкомолекулярных форм, описанных в данном документе. Способы модификации антител хорошо известны в данной области техники (например, патенты США № 5057313 и № 5156840).

#### *Антитела со сниженной эффекторной функцией*

Взаимодействие антител и комплексов антитело – антиген с клетками иммунной системы запускает различные реакции, называемые в данном документе эффекторными функциями. Иммуноопосредованные эффекторные функции включают в себя два основных механизма: антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗЦК) и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ). Оба указанных механизма опосредованы константной областью белка иммуноглобулина. Таким образом, Fc-домен антитела является той частью, которая определяет взаимодействия с иммунными эффекторными механизмами.

Антитела IgG активируют эффекторные пути иммунной системы путем связывания с представителями семейства Fcγ-рецепторов клеточной поверхности и с C1q системы комплемента. Лигирование эффекторных белков кластеризованными антителами запускает многие реакции, включая высвобождение воспалительных цитокинов, регуляцию продукции антигенов, эндоцитоз и уничтожение клеток. Указанные реакции могут спровоцировать нежелательные побочные эффекты, такие как воспаление и элиминация клеток, несущих антиген. Соответственно, в данном изобретении дополнительно представлены связывающие белки против интегрина, включая антитела (например, антитела против αβ1, антитела против αβ1 и αβ6), со сниженными эффекторными функциями.

Эффекторную функцию антитела согласно данному изобретению можно определить с помощью одного из многих известных анализов. Эффекторная функция антитела может быть снижена по сравнению со вторым антителом. В некоторых вариантах осуществления, когда представляющее интерес антитело было модифицировано для снижения эффекторной функции, второе антитело может представлять собой немодифицированную или родительскую версию указанного антитела (такую как иллюстративное антитело 1-20 с Fc-областью дикого (например, IgG1, IgG2, IgG3)).

Эффекторные функции включают в себя АЗКЦ, посредством которого антитела связывают Fc-рецепторы на цитотоксических Т-клетках, клетках – естественных киллерах (NK) или макрофагах, приводя к гибели клеток, и КЗЦ, которая представляет собой гибель клеток, индуцированную активацией каскада комплемента (см. Обзор в Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15: 203-234 (1997); Ward and Ghetie, *Therapeutic Immunol.*, 2: 77-94 (1995); и Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-492 (1991)). Такие эффекторные функции, как правило,

требуют, чтобы Fc-область была объединена со связывающим доменом (например, переменным доменом антитела), и ее можно оценить с использованием стандартных анализов, известных в данной области техники (см., например, WO 05/018572, WO 05/003175 и U.S. 6242195).

Эффекторных функций можно избежать, используя фрагменты антител, лишенные Fc-домена, такие как Fab, Fab'2 или одноцепочечный Fv. Альтернативой является использование антитела подтипа IgG4, которое связывается с FcγRI, но плохо связывается с C1q, FcγRII и RIII. Однако антитела IgG4 могут образовывать агрегаты, поскольку они обладают плохой стабильностью при низком pH по сравнению с антителами IgG1. Стабильность антитела IgG4 может быть улучшена путем замены аргинина в положении 409 (согласно системе нумерации ЕС, предложенной в Kabat et al., *Sequences of proteins of immunological interest*, 1991, 5<sup>th</sup> ed.) на любой из следующих остатков: лизин, метионин, треонин, лейцин, валин, глутаминовую кислоту, аспарагин, фенилаланин, триптофан или тирозин. В качестве альтернативы или дополнения, стабильность антитела IgG4 может быть улучшена путем замены домена CH3 антитела IgG4 доменом CH3 антитела IgG1 или путем замены доменов CH2 и CH3 IgG4 доменами CH2 и CH3 IgG1. Соответственно, описанные в данном документе антитела, которые имеют изотип IgG4, могут иметь модификации в положении 409 и/или замену доменов CH2 и/или CH3 доменами IgG1, чтобы повысить стабильность указанного антитела при одновременном снижении эффекторной функции. Подтип IgG2 также имеет сниженное связывание с Fc-рецепторами, но сохраняет значительное связывание с аллотипом H131 FcγRIIa и с C1q. Таким образом, могут потребоваться дополнительные изменения в последовательности Fc для устранения связывания со всеми Fc-рецепторами и с C1q.

Несколько эффекторных функций антител, включая АЗКЦ, опосредованы Fc-рецепторами (FcR), которые связывают Fc-область антитела. Аффинность антитела к конкретному FcR и, следовательно, эффекторную активность, опосредованную данным антителом, можно модулировать путем изменения аминокислотной последовательности, и/или путем посттрансляционных модификаций Fc и/или константной области антитела. FcR определяются по их специфичности в отношении изотипов иммуноглобулинов; Fc-рецепторы к антителам IgG называются FcγR, к IgE – FcεR, к IgA – FcαR и так далее. Были идентифицированы три подкласса FcγR: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16). Как FcγRII, так и FcγRIII имеют два типа: FcγRIIa (CD32a) и FcγRIIb (CD32b); и FcγRIIIa (CD16a) и FcγRIIIb (CD16b). Поскольку каждый подкласс FcγR кодируется двумя или тремя генами, а альтернативный сплайсинг РНК приводит к множественным транскриптам, существует большое разнообразие изоформ FcγR. Например, FcγRII (CD32) включает в себя изоформы IIa, IIb1, IIb2 IIb3 и IIc.

Сайт связывания с FcγR на антителах человека и мыши был ранее картирован в так называемой «нижней шарнирной области», состоящей из остатков G233-S239 (система нумерации ЕС, как в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), Woof et al., *Molec. Immunol.* 23: 319-330 (1986); Duncan et al., *Nature* 332: 563 (1988); Canfield and Morrison, *J. Exp. Med.* 173: 1483-1491 (1991); Chappel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88: 9036-9040 (1991)). Из остатков G233-S239, P238 и S239 относятся к числу тех, которые упоминаются как возможно участвующие в связывании. Другими остатками, участвующими в связывании с FcγR, являются следующие: G316-K338 (Woof et al., *Mol. Immunol.*, 23: 319-330 (1986)); K274-R301 (Sarmay et al., *Molec. Immunol.* 21: 43-51 (1984)); Y407-R416 (Gergely et al., *Biochem. Soc. Trans.* 12: 739-743 (1984) и Shields et al., *J Biol Chem* 276: 6591-6604 (2001), Lazar GA et al., *Proc Natl Acad Sci* 103: 4005-4010 (2006)); N297; T299; E318; L234-S239; N265-E269; N297-T299; и A327-I332. Эти и другие участки или области из аминокислотных остатков, участвующих в

связывании FcR, могут быть очевидны для квалифицированного специалиста при изучении кристаллических структур комплексов Ig-FcR (см., например, Sondermann et al. 2000 *Nature* 406 (6793): 267-73 и Sondermann et al. 2002 *Biochem Soc Trans.* 30 (4): 481-6). Соответственно, антитела против интегрина согласно данному изобретению включают в себя модификации одного или большего числа из вышеуказанных остатков для снижения эффекторной функции в случае необходимости.

Другой подход к изменению эффекторной функции моноклонального антитела заключается в мутировании аминокислот на поверхности данного моноклонального антитела, которые участвуют в эффекторных взаимодействиях (Lund, J., et al. (1991) *J. Immunol.* 147 (8): 2657-62; Shields, R. L. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276 (9): 6591-604).

Чтобы снизить эффекторную функцию, можно использовать комбинации сегментов последовательностей разных подтипов (например, комбинации IgG2 и IgG4), чтобы обеспечить большее снижение связывания с Fc $\gamma$ -рецепторами, чем может обеспечить один из подтипов самостоятельно (Armour et al., *Eur. J. Immunol.*, 29: 2613-1624 (1999); *Mol. Immunol.*, 40: 585-593 (2003)). В данной области техники известно большое число Fc-вариантов, имеющих измененную и/или сниженную аффинность к некоторым или всем подтипам Fc-рецептора (и, следовательно, к эффекторным функциям). См., например, US 2007/0224188; US 2007/0148171; US 2007/0048300; US 2007/0041966; US 2007/0009523; US 2007/0036799; US 2006/0275283; US 2006/0235208; US 2006/0193856; US 2006/0160996; US 2006/0134105; US 2006/0024298; US 2005/0244403; US 2005/0233382; US 2005/0215768; US 2005/0118174; US 2005/0054832; US 2004/0228856; US 2004/132101; US 2003/158389; см. также US 7183387; 6737056; 6538124; 6528624; 6194551; 5624821; 5648260; и Wang, X., Mathieu, M. & Brezski, R.J., *Protein Cell*, (2018) 9: 63. doi.org/10.1007/s13238-017-0473-8. В определенных вариантах осуществления аминокислоты в положениях 232, 234, 235, 236, 237, 239, 264, 265, 267, 269, 270, 299, 325, 328, 329 и 330 (пронумерованные в соответствии с системой нумерации EC) заменены для снижения эффекторной функции. Неограничивающие примеры замен, которые снижают эффекторную функцию, включают в себя одну или большее число из следующих: K322A; L234A/L235A; G236T; G236R; G236Q; H268A; H268Q; V309L; A330S/P331S; V234A/G237A/P238S/ H268A/V309L/A330S/P331S; E233P/L234V/L235A/G236Q + A327G/A330S/P331S; и L235E + E318A/K320A/K322A.

Описанные в данном документе антитела со сниженной эффекторной функцией включают в себя антитела со сниженной аффинностью связывания с одним или большим числом Fc-рецепторов (FcR) по сравнению с родительским или невариантным антителом. Соответственно, антитела, описанные в данном документе, со сниженной аффинностью связывания с FcR включают в себя антитела, у которых проявляется снижение аффинности связывания с одним или большим числом Fc-рецепторов в 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 10, 20, 25 или больше раз по сравнению с родительским или невариантным антителом. В некоторых вариантах осуществления любое из антител, описанных в данном документе, со сниженной эффекторной функцией связывается с FcR с аффинностью, которая в около 10 раз ниже по сравнению с таковой для родительского или невариантного антитела. В других вариантах осуществления любое из антител, описанных в данном документе, со сниженной эффекторной функцией связывается с FcR с аффинностью, которая в около 15 раз ниже или в около 20 раз ниже по сравнению с таковой для родительского или невариантного антитела. Указанный FcR-рецептор может представлять собой один или большее число из следующих: Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) и Fc $\gamma$ RIII, и их изоформ, и Fc $\epsilon$ R, Fc $\mu$ R, Fc $\delta$ R, и/или Fc $\alpha$ R. В конкретных вариантах осуществления аффинность любого из антител, описанных в данном документе, со сниженной эффекторной функцией, к Fc $\gamma$ RIIIa снижена в 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5 или большее число раз.

При КЗЦ комплекс антитело – антиген связывает комплемент, что приводит к активации каскада комплемента и образованию мембраноатакующего комплекса. Активация классического пути комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), которые связаны с распознанным ими антигенами; таким образом, активация каскада комплемента частично регулируется аффинностью связывания иммуноглобулина с белком C1q. Для активации каскада комплемента необходимо, чтобы C1q связался с по меньшей мере двумя молекулами IgG1, IgG2 или IgG3, но только с одной молекулой IgM, прикрепленной к антигенной мишени (Ward and Ghetic, *Therapeutic Immunology* 2: 77-94 (1995) p. 80). Для оценки активации комплемента может быть выполнен анализ КЗЦ, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202: 163 (1996).

Было высказано предположение, что в связывании с C1q участвуют различные остатки молекулы IgG, включая остатки Glu318, Lys320 и Lys322 в домене CH2, аминокислотный остаток 331, расположенный на повороте в непосредственной близости от той же бета-цепи, остатки Lys235 и Gly237, расположенные в нижней шарнирной области, и остатки 231-238, расположенные в N-концевой области домена CH2 (см., например, Xu et al., *J. Immunol.* 150: 152A (Abstract) (1993), WO94/29351; Tao et al., *J. Exp. Med.*, 178: 661-667 (1993); Brekke et al., *Eur. J. Immunol.*, 24: 2542-47 (1994); Burton et al; *Nature*, 288: 338-344 (1980); Duncan and Winter, *Nature* 332: 738-40 (1988); Idusogie et al *J Immunol* 164: 4178-4184 (2000; U.S. 5648260 и U.S. 5624821). Антитела, описанные в данном документе, со сниженным связыванием C1q могут содержать аминокислотную замену в одном, двух, трех или четырех аминокислотных положениях 270, 322, 329 и 331 области Fc IgG человека, при этом нумерация остатков в области Fc IgG соответствует системе нумерации ЕС, как по Кабату.

В качестве примера для IgG1, две мутации в терминальной области COOH домена CH2 IgG1 человека – K322A и R329A – не активируют путь КЗЦ и, как было показано, приводят к снижению связывания с C1q в больше чем 100 раз (US 6242195).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитело согласно данному изобретению проявляет сниженное связывание с белком комплемента по сравнению со вторым антителом (таким как иллюстративное антитело 1-20 с Fc-областью дикого типа (например, IgG1, IgG2, IgG3)). В определенных вариантах осуществления антитело согласно данному изобретению проявляет связывание с белком C1q, сниженное в около 1,5 или большее число раз, около 2 или большее число раз, около 3 или большее число раз, около 4 или большее число раз, около 5 или большее число раз, около 6 или большее число раз, около 7 или большее число раз, около 8 или большее число раз, около 9 или большее число раз, около 10 или большее число раз, или в около 15 или большее число раз по сравнению со вторым антителом.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее число указанных остатков могут быть модифицированы, замещены или удалены, или один или большее число аминокислотных остатков могут быть вставлены таким образом, чтобы снизить КЗЦ-активность антител, представленных в данном документе.

В определенных других вариантах осуществления в данном изобретении представлено антитело, которое проявляет сниженное связывание с одним или большим числом FcR-рецепторов, но которое сохраняет свою способность связывать комплемент (например, в той же степени или, в некоторых вариантах осуществления, в меньшей степени, чем нативное, невариантное или родительское антитело). Соответственно, антитело согласно данному изобретению может связывать и активировать комплемент, проявляя при этом сниженное связывание с FcR, таким как, например, FcγRIIa (например, FcγRIIa, экспрессируемым на тромбоцитах). Такое антитело со сниженным или отсутствующим связыванием с FcγRIIa (например, таким как FcγRIIa,

экспрессируемый на тромбоцитах), но которое может связывать C1q и активировать каскад комплемента, по меньшей мере в некоторой степени снизит риск тромбоэмболических явлений при сохранении, возможно, желательных эффекторных функций. В альтернативных вариантах осуществления антитело согласно данному изобретению проявляет сниженное связывание с одним или большим числом FcR, но сохраняет свою способность связывать один или большее число других FcR. См., например, US 2007-0009523, 2006-0194290, 2005-0233382, 2004-0228856 и 2004-0191244, в которых описаны различные аминокислотные модификации, которые производят антитела со сниженным связыванием с FcRI, FcRII и/или FcRIII, а также аминокислотные замены, которые приводят к повышению связывания с одним FcR, но снижению связывания с другим FcR.

Соответственно, эффекторные функции, в которые вовлечена константная область описанного в данном документе антитела, могут модулироваться путем изменения свойств указанной константной области и, в частности, Fc-области. В определенных вариантах осуществления антитела, имеющее сниженную эффекторную функцию, сравнивается со вторым антителом с эффекторной функцией, которое может быть невариантным, нативным или родительским антителом, содержащим нативную константную область или Fc-область, которая опосредует эффекторную функцию. В некоторых случаях, если антитело представляет собой антитело против интегрина (например, антитело против  $\alpha\beta 1$ ; антитело против  $\alpha\beta 1$  и против  $\alpha\beta 6$ ; антитело против  $\alpha\beta 1$  и против другого RGD-связывающего интегрин), являющееся антителом IgG1 человека с модифицированным Fc, снижающим эффекторную функцию, второе антитело представляет собой антитело IgG1 дикого типа человека.

Нативная константная область содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности цепи константной области, встречающейся в природе. Предпочтительно, контрольная молекула, используемая для оценки относительной эффекторной функции, содержит Fc-область того же типа/подтипа, что и тестируемое или вариантное антитело. Вариантная или измененная область Fc или константная область содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности цепи нативной константной области по меньшей мере на одну аминокислотную модификацию (например, такую как посттрансляционная модификация, аминокислотная модификация, вставка или делеция). Соответственно, вариантная константная область может содержать одну или большее число аминокислотных замен, делеций или вставок, которые приводят к измененным посттрансляционным модификациям, включая, например, измененный паттерн гликозилирования. Вариантная константная область может иметь сниженную эффекторную функцию.

Антитела со сниженной (-ыми) эффекторной (-ыми) функцией (-ями) могут быть получены путем конструирования или продуцирования антител с вариантной константной областью, Fc-областью или областью тяжелой цепи. Для получения антител с измененной функцией и/или активностью могут использоваться технология рекомбинантной ДНК и/или условия клеточной культуры и экспрессии. Например, технология рекомбинантной ДНК может использоваться для создания одной или большего числа аминокислотных замен, делеций или вставок в областях (таких как, например, Fc-область или константная область), которые влияют на функцию антитела, включая эффекторные функции. В качестве альтернативы изменения в посттрансляционных модификациях, таких как, например, паттерны гликозилирования, могут быть достигнуты путем манипулирования клеткой-хозяином и условиями культуры клеток и условиями экспрессии, с помощью которых получается данное антитело.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения представлено антитело, содержащее или состоящее из трех последовательностей CDR варибельной области тяжелой цепи и трех

последовательностей CDR варибельной области легкой цепи (определение по уточненному Чотиа, по Кабату или любое другое определение CDR) из иллюстративных антител 1-20, и дополнительно содержащее Fc-область (например, Fc-область IgG4), которая придает сниженную эффекторную функцию по сравнению с нативной или родительской Fc-областью.

5           Способы получения любого из вышеуказанных вариантов антител, содержащих аминокислотные замены, хорошо известны в данной области техники. Данные методы включают в себя следующие, но не ограничиваются ими: получение с помощью сайт-направленного (или опосредованного олигонуклеотидом) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза подготовленной молекулы ДНК, кодирующей данное антитело или, по меньшей мере, константную область данного антитела. Сайт-направленный мутагенез  
10 хорошо известен в данной области техники (см., например, Carter et al., *Nucleic Acids Res.*, 13: 4431-4443 (1985) и Kunkel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 488 (1987)). ПЦР-мутагенез также подходит для получения вариантов аминокислотных последовательностей исходного полипептида. См. Higuchi, in *PCR Protocols*, pp.177-183 (Academic Press, 1990); и Vallette et al., *Nuc. Acids Res.* 17: 723-733 (1989). Другой способ получения вариантов последовательности – кассетный мутагенез – основан на методике, описанной в работе Wells et al.,  
15 *Gene*, 34: 315-323 (1985).

#### *Антитела с измененным гликозилированием*

Различные формы гликозилирования могут значительным образом влиять на терапевтические свойства, включая фармакокинетику, фармакодинамику, взаимодействие с рецепторами и тканеспецифическое  
20 нацеливание (Graddis et al., 2002, *Curr Pharm Biotechnol.* 3: 285-297). В частности, для антител структура олигосахарида может влиять на свойства, относящиеся к устойчивости к протеазам, периоду полужизни антитела в сыворотке крови, опосредованному FcRn-рецептором, фагоцитозу и обратной связи антител, в дополнение к эффекторным функциям антитела (например, связыванием с комплексом C1 комплемента, который индуцирует КЗЦ, и связыванием с FcγR-рецепторами, которые отвечают за модуляцию пути АЗКЦ)  
25 (Nose and Wigzell, 1983; Leatherbarrow and Dwek, 1983; Leatherbarrow et al., 1985; Walker et al., 1989; Carter et al., 1992, *PNAS*, 89: 4285-4289).

Соответственно, другое средство модуляции эффекторной функции антител включает в себя изменение гликозилирования константной области антитела. Измененное гликозилирование включает в себя, например, уменьшение или увеличение числа гликозилированных остатков, изменение структуры или расположения  
30 гликозилированных остатков, а также изменение углеводной (-ых) структуры (структур). Олигосахариды, обнаруживаемые в IgG человека, влияют на степень их эффекторной функции (Raju, T.S. *BioProcess International* April 2003. 44-53); микрогетерогенность олигосахаридов IgG человека может влиять на биологические функции, такие как КЗЦ и АЗКЦ, связывание с различными Fc-рецепторами и связывание с белком C1q (Wright A. & Morrison SL. *TIBTECH* 1997, 15 26-32; Shields et al. *J Biol Chem.* 2001 276 (9): 6591-  
35 604; Shields et al. *J Biol Chem.* 2002; 277 (30): 26733-40; Shinkawa et al. *J Biol Chem.* 2003 278 (5): 3466-73; Umana et al. *Nat Biotechnol.* 1999 Feb; 17 (2): 176-80). Например, способность IgG связывать C1q и активировать каскад комплемента может зависеть от наличия, отсутствия или модификации углеводной части, расположенной между двумя доменами CH2 (которая обычно закреплена в Asn297) (Ward and Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2: 77-94 (1995)).

40 Сайты гликозилирования в Fc-содержащем полипептиде, например антителе, таком как антитело IgG, могут быть идентифицированы с помощью стандартных методик. Идентификация сайта гликозилирования может

быть экспериментальной или основанной на анализе последовательности или данных моделирования. Были описаны консенсусные мотивы, то есть аминокислотные последовательности, распознаваемые различными гликозилтрансферазами. Например, консенсусным мотивом для мотива N-связанного гликозилирования часто является NXT или NXS, где X может быть любой аминокислотой, кроме пролина. Также было описано несколько алгоритмов для определения местоположения потенциального мотива гликозилирования. Соответственно, для выявления потенциальных сайтов гликозилирования в антителе или Fc-содержащем фрагменте последовательность антитела исследуется, например, с использованием общедоступных баз данных, таких как веб-сайт, предоставляемый Центром анализа биологических последовательностей (англ. «Center for Biological Sequence Analysis»; см. сервисы NetNGlyc для прогнозирования сайтов N-связанного гликозилирования, и сервисы NetOGlyc для прогнозирования сайтов O-связанного гликозилирования).

*Исследования in vivo* подтвердили снижение эффекторной функции агликозилированных антител. Например, агликозилированное антитело против CD8 неспособно истощать клетки, несущие CD8, у мышей (Isaacs, 1992 *J. Immunol.* 148: 3062), а агликозилированное антитело против CD3 не индуцирует синдром высвобождения цитокинов у мышей или людей (Boyd, 1995 *см. выше*; Friend, 1999 *Transplantation* 68: 1632).

Важно отметить, что, хотя удаление гликанов в домене CH2, по-видимому, оказывает значительное влияние на эффекторную функцию, другие функциональные и физические свойства антитела остаются неизменными. В частности, было показано, что удаление гликанов практически не влияло на период полужизни в сыворотке крови и связывание с антигеном (Nose, 1983 *см. выше*; Tao, 1989 *см. выше*; Dorai, 1991 *см. выше*; Hand, 1992 *см. выше*; Hobbs, 1992 *Mol. Immunol.* 29: 949).

Антитела согласно данному изобретению могут быть модифицированы или изменены с целью снижения эффекторной (-ых) функции (функций) по сравнению со вторым антителом (например, иллюстративным антителом 1-20 с Fc-областью IgG1, IgG2, IgG3 дикого типа человека). Способы изменения сайтов гликозилирования антител описаны, например, в US 6350861 и US 5714350, WO 05/18572 и WO 05/03175; данные способы могут использоваться для получения антител согласно данному изобретению с измененным, сниженным или отсутствующим гликозилированием.

В некоторых случаях антитела согласно данному изобретению содержат Fc-область (например, Fc IgG1 человека), которая имеет модификацию, которая снижает или устраняет гликозилирование в Fc-области (например, замена T299A или N297Q (нумерация в соответствии с системой нумерации ЕС)).

В качестве альтернативы антитела согласно данному изобретению могут продуцироваться в клеточной линии, которая обеспечивает желаемый профиль гликозилирования. Например, для получения могут использоваться клетки, которые производят слабоафукозилированные антитела, такие как клетки CHO.

В другом варианте осуществления производственными процессами и/или содержимым или условиями среды можно манипулировать для модуляции содержания галактозы и/или высокого содержания маннозы. В одном варианте осуществления содержание галактозы/высокое содержание маннозы в антителе низкое или сниженное.

#### *Созревание аффинности*

В одном варианте осуществления описанное в данном документе антитело против интегрина модифицировано, например, путем мутагенеза, чтобы обеспечить пул модифицированных антител. Данные модифицированные антитела затем оценивают для идентификации одного или большего числа антител, обладающих измененными функциональными свойствами (например, улучшенным связыванием,

улучшенной стабильностью, сниженной антигенностью или повышенной стабильностью *in vivo*). В одном варианте реализации технология библиотеки дисплея используется для выбора или скрининга пула модифицированных антител. Затем антитела с более высокой аффинностью идентифицируются из второй библиотеки, например, с использованием более строгих или более конкурентных условий связывания и промывки. Также могут применяться другие методики скрининга.

В некоторых вариантах реализации мутагенез нацелен на области, находящиеся или вероятно находящиеся на границе связывания. Если, например, идентифицированные связывающие белки являются антителами, то мутагенез может быть направлен на области CDR тяжелых или легких цепей, как описано в данном документе. Кроме того, мутагенез может быть направлен на каркасные области, расположенные вблизи или смежно с CDR, в частности, например, каркасные области, расположенные в пределах 10, 5 или 3 аминокислот от области соединения CDR. В случае антител мутагенез также может быть ограничен одним или небольшим числом CDR, например, для поэтапного улучшения.

В одном варианте осуществления мутагенез применяется для придания антителу большего сходства с одной или большим числом последовательностей зародышевой линии. Один иллюстративный способ придания антителам сходства с последовательностями зародышевой линии может включать в себя: идентификацию одной или большего числа последовательностей зародышевой линии, которые похожи (например, наиболее похожи в конкретной базе данных) на последовательность выделенного антитела. Затем в выделенном антителе могут быть произведены мутации (на уровне аминокислот), либо постепенно, либо в комбинации, либо и то, и другое. Например, создается библиотека нуклеиновых кислот, которая включает в себя последовательности, кодирующие некоторые или все возможные мутации зародышевой линии. Затем мутированные антитела исследуют, например, для идентификации антитела, которое имеет один или большее число дополнительных остатков зародышевой линии по отношению к выделенному антителу и которое все еще является полезным (например, обладает функциональной активностью). В одном варианте осуществления в выделенное антитело вводят как можно больше остатков зародышевой линии.

В одном варианте осуществления мутагенез применяется для замены или вставки одного или большего числа остатков зародышевой линии в область CDR. Например, остаток CDR зародышевой линии может быть из последовательности зародышевой линии, которая похожа (например, наиболее похожа) на изменяемую переменную область. После мутагенеза можно оценить активность (например, связывание или другую функциональную активность) антитела, чтобы определить, переносится ли остаток или остатки зародышевой линии. Аналогичный мутагенез может выполняться в каркасных областях.

Отбор последовательности зародышевой линии может выполняться различными способами. Например, последовательность зародышевой линии может быть отобрана, если она соответствует заранее определенным критериям селективности или сходства, например, по меньшей мере определенной процентной идентичности, например, по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 99,5%-ной идентичности по сравнению с донорским нечеловеческим антителом. Отбор может выполняться с использованием по меньшей мере 2, 3, 5 или 10 последовательностей зародышевых линий. В случае CDR1 и CDR2 идентификация похожей последовательности зародышевой линии может включать в себя выбор одной такой последовательности. В случае CDR3 идентификация похожей последовательности зародышевой линии может включать в себя выбор одной такой последовательности, но может включать в себя использование двух последовательностей зародышевой линии, которые отдельно вносят вклад в аминоконцевую часть и карбоксиконцевую часть. В других вариантах реализации используют больше чем одну или две

последовательности зародышевой линии, например, для формирования консенсусной последовательности. Расчет «идентичности последовательностей» для двух последовательностей выполняется следующим образом. Последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения (например, могут вводиться гэпы в одну или обе из первой и второй аминокислотных или нуклеотидных последовательностей с целью оптимального выравнивания, и могут игнорироваться негомологичные последовательности с целью сравнения). Оптимальное выравнивание определяется по наивысшей оценке с использованием программы GAP в программном пакете GCG с матрицей подсчета оценок Blossum 62, со штрафом 12 за гэп, штрафом 4 за увеличение гэпа и штрафом 5 за смещение рамки гэпа. Затем сравниваются аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих аминокислотных или нуклеотидных положениях. Когда положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, тогда молекулы в данном положении идентичны. Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от числа идентичных положений, встречающихся в обеих последовательностях.

В других вариантах осуществления антитело может быть модифицировано с целью создания измененного паттерна гликозилирования (т. е. измененного по сравнению с исходным или нативным паттерном гликозилирования). При употреблении в данном контексте, «измененный» означает имеющий удаление одного или большего числа углеводных фрагментов и/или добавление одного или большего числа сайтов гликозилирования к исходному антителу. Добавление сайтов гликозилирования к описываемым в данном документе антителам может осуществляться путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала консенсусные последовательности сайтов гликозилирования; такие методики хорошо известны в данной области техники. Другим способом увеличения числа углеводных фрагментов антител является химическое или ферментативное связывание гликозидов с аминокислотными остатками данного антитела. Такие способы описаны, например, в WO 87/05330 и в работе Arlin and Wriston (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 22: 259-306. Удаление любых углеводных фрагментов, присутствующих в антителах, можно осуществлять химическим или ферментативным путем, как описано в данной области техники (Hakimuddin et al. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.*, 259: 52; Edge et al. (1981) *Anal. Biochem.*, 118: 131; и Thotakura et al. (1987) *Meth. Enzymol.*, 138: 350). См., например, патент США № 5869046 для модификации, которая повышает время полужизни *in vivo* путем предоставления эпитопа связывания рецептора реутилизации.

В отличие от CDR, в структуру каркасных областей (FR) могут быть внесены более существенные изменения без отрицательного воздействия на связывающие свойства антитела. Изменения в FR включают в себя, но не ограничиваются ими, гуманизацию каркаса, который имеет происхождение, отличное от человеческого, или конструирование определенных каркасных остатков, которые важны для контакта с антигеном или для стабилизации сайта связывания, например – изменение класса или подкласса константной области, изменение конкретных аминокислотных остатков, которые могут изменять эффекторную функцию, такую как связывание Fc-рецептора (Lund et al., *J. Immunol.*, 147: 2657-62 (1991); Morgan et al., *Immunology*, 86: 319-24 (1995)), или изменение вида, от которого происходит данная константная область.

Антитела против интегрина могут быть в форме полноразмерных (или целых) антител или в форме низкомолекулярных форм (например, биологически активных фрагментов антител или миниантител) антител против интегрина, например, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fd, dAb, scFv и sc(Fv)<sub>2</sub>. Другие антитела против интегрина, охватываемые данным изобретением, включают в себя однодоменное антитело (sdAb), содержащее единственную вариантную цепь, такую как VH или VL, или ее биологически активный фрагмент. См.,

например, Moller et al., *J. Biol. Chem.*, 285 (49): 38348-38361 (2010); Harmsen et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77 (1): 13-22 (2007); U.S. 2005/0079574 и Davies et al. (1996) *Protein Eng.*, 9 (6): 531-7. Как и полноразмерное антитело, sdAb способно селективно связываться со специфическим антигеном (например,  $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 1$  и  $\alpha\beta 6$ ). Имея молекулярную массу, составляющую всего лишь 12-15 кДа, sdAb намного меньше обычных антител и даже меньше, чем Fab-фрагменты и одноцепочечные переменные фрагменты.

В определенных вариантах осуществления антитело против интегрина, его антигенсвязывающий фрагмент или его низкомолекулярные антитела специфически связываются с  $\alpha\beta 1$ , или как с  $\alpha\beta 1$ , так и с  $\alpha\beta 6$ , и снижают тяжесть симптомов при введении пациентам с одним или большим числом из следующих, или животным моделям со следующим: фиброз (например, фиброз печени, фиброз легких, фиброз почек), острое поражение легких, острое поражение почек. В одном варианте осуществления антитело против интегрина или его низкомолекулярные антитела подавляют развитие заболевания в модели идиопатического легочного фиброза (Degryse et al., *Am J Med Sci.*, 341 (6): 444-9 (2011)). Данные характеристики антитела против интегрина или его низкомолекулярных антител могут быть измерены в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева

В данном изобретении также представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные в данном документе антитела. В данном документе представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 описанных в данном документе антител против интегрина (например, иллюстративных антител 1-20). Также представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 описанных в данном документе антител против интегрина (например, иллюстративных антител 1-20). В данном документе представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 описанных в данном документе антител против интегрина (например, иллюстративных антител 1-20). Также представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи (VH) описанных в данном документе антител против интегрина (например, иллюстративных антител 1-20) и/или нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи (VL) описанных в данном документе антител против интегрина (например, иллюстративных антител 1-20). В определенных случаях в данном документе представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие VH и/или VL описанных в данном документе антител против интегрина (например, иллюстративных антител 1-20), связанные с константными областями тяжелой цепи человека и/или легкой цепи человека, соответственно. В данном документе также представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие как VH, так и VL описанных в данном документе антител против интегрина (например, иллюстративных антител 1-20). В некоторых случаях описанные в данном документе нуклеиновые кислоты включают в себя нуклеиновую кислоту, кодирующую Fc-область антитела человека (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека). В определенных случаях указанные нуклеиновые кислоты включают в себя нуклеиновую кислоту, кодирующую Fc-область антитела человека, которая была модифицирована для снижения или устранения эффекторной функции (например, замена N297Q или T299A в Fc-области IgG1 человека (нумерация в соответствии с системой нумерации ЕС)). В некоторых случаях указанные нуклеиновые кислоты включают в себя нуклеиновую кислоту, кодирующую Fc-фрагмент, который представляет собой Fc IgG1 человека, Fc IgG2 человека, Fc IgG3 человека, Fc IgG4 человека, Fc агликозилированного IgG1 человека, Fc SAA IgG2 человека, Fc IgG4(S228P) человека или Fc агликозилированного IgG4(S228P)/G1 человека.

В данном документе также представлены векторы (например, векторы экспрессии), содержащие любую из нуклеиновых кислот, описанных выше.

Кроме того, в данном изобретении представлены клетки-хозяева (например, клетки бактерий, клетки дрожжей, клетки насекомых или клетки млекопитающих), содержащие вектор (-ы) или нуклеиновую (-ые) кислоту (-ы), описанные выше.

#### Способы получения антител против интегрина

Антитела, например такие, как описанные выше, могут быть получены, например, путем получения и экспрессии синтетических генов, которые кодируют указанные аминокислотные последовательности.

Способы получения вариантов (например, содержащих аминокислотные замены) любого из антител против интегрина хорошо известны в данной области техники. Данные способы включают в себя следующие, но не ограничиваются ими: получение с помощью сайт-направленного (или опосредованного олигонуклеотидом) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза полученной молекулы ДНК, кодирующей данное антитело или любой его фрагмент (например, каркасную область, CDR, константную область). Сайт-направленный мутагенез хорошо известен в данной области техники (см., например, Carter et al., *Nucleic Acids Res.*, 13: 4431-4443 (1985) и Kunkel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 488 (1987)). ПЦР-мутагенез также подходит для получения вариантов аминокислотных последовательностей исходного полипептида. См. Higuchi, in *PCR Protocols*, pp.177-183 (Academic Press, 1990); и Vallette et al., *Nuc. Acids Res.* 17: 723-733 (1989). Другой способ получения вариантов последовательности – кассетный мутагенез – основан на методике, описанной в работе Wells et al., *Gene*, 34: 315-323 (1985).

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут продуцироваться в бактериальных или эукариотических клетках. Некоторые антитела, например, Fab', могут продуцироваться в бактериальных клетках, например, в клетках *E. coli*. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты также могут продуцироваться в эукариотических клетках, таких как трансформированные клеточные линии (например, CHO, 293E, COS, Hela). В дополнение к этому, антитела (например, scFv') могут быть экспрессированы в клетках дрожжей, таких как *Pichia* (см., например, Powers et al., *J Immunol Methods*, 251: 123-35 (2001)), *Hansenula*, или *Saccharomyces*. В одном варианте осуществления описанные в данном документе антитела продуцируются в клеточной линии яичника китайского хомяка (CHO) с дефицитом дигидрофолатредуктазы, DG44. В другом варианте осуществления описанные в данном документе антитела продуцируются в клеточной линии DG44i. Для получения представляющих интерес антитела или его антигенсвязывающих фрагментов конструируют полинуклеотид, кодирующий данное антитело, вводят его в вектор экспрессии и затем экспрессируют его в подходящих клетках-хозяевах. Для получения рекомбинантного вектора экспрессии, трансфекции клеток-хозяев, отбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и выделения антитела применяют стандартные методики молекулярной биологии.

Если антитело должно экспрессироваться в бактериальных клетках (например, *E. coli*), вектор экспрессии должен иметь характеристики, которые позволяют амплифицировать данный вектор в данных бактериальных клетках. Кроме того, если такую *E. coli*, как JM109, DH5 $\alpha$ , HB101 или XL1-Blue, применяют в качестве хозяина, вектор должен иметь промотор, например, промотор lacZ (Ward et al., 341: 544-546 (1989), промотор araB (Better et al., *Science*, 240: 1041-1043 (1988)) или промотор T7, который может обеспечить эффективную экспрессию в *E. coli*. Примеры подобных векторов включают в себя, например, векторы серий M13, векторы серий pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, pGEX-5X-1 (Pharmacia), «систему QIAexpress» (QIAGEN), pEGFP

и рЕТ (когда применяют данный вектор экспрессии, хозяином, предпочтительно, является BL21, экспрессирующая РНК-полимеразу Т7). Для экспрессии антител вектор экспрессии может содержать сигнальную последовательность. Для продуцирования в периплазму *E.coli* сигнальную последовательность *pelB* (Lei et al., *J. Bacteriol.*, 169: 4379 (1987)) можно применять в качестве сигнальной последовательности для секретиции антител. Для бактериальной экспрессии можно применять способы с использованием хлорида кальция или способы электропорации для введения вектора экспрессии в бактериальную клетку.

Если антитело должно экспрессироваться в клетках животных, таких как клетки CHO, COS и NIH3T3, вектор экспрессии включает в себя промотор, необходимый для экспрессии в указанных клетках, например, промотор SV40 (Mulligan et al., *Nature*, 277: 108 (1979)), промотор MMLV-LTR, промотор EF1 $\alpha$  (Mizushima et al., *Nucleic Acids Res.*, 18: 5322 (1990)), или промотор CMV. В дополнение к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноглобулин или его домен, рекомбинантные векторы экспрессии могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации), и селективируемые маркерные гены. Селективируемый маркерный ген облегчает отбор клеток-хозяев, в которые данный вектор был введен (см., например, патенты США № 4399216, № 4634665 и № 5179017). Например, селективируемый маркерный ген обычно придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую данный вектор был введен. Примеры векторов с селективируемыми маркерами включают в себя pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV и pOP13.

В одном варианте осуществления антитела продуцируются в клетках млекопитающих. Иллюстративные клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии антитела включают в себя клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO) (включая клетки *dhfr*<sup>-</sup> CHO, описанные в Urlaub and Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220, применяемые с DHFR-селективируемым маркером, например, как описано в Kaufman and Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159: 601-621), клетки 293 эмбриональной почки человека (например, 293, 293E, 293T), клетки COS, клетки NIH3T3, лимфоцитарные клеточные линии, например, клетки миеломы NS0 и клетки SP2, и клетку от трансгенного животного, например, трансгенного млекопитающего. Например, данная клетка представляет собой эпителиальную клетку молочной железы.

В иллюстративной системе для экспрессии антител рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь любого из антител, описанных в данном документе, соответственно (например, иллюстративных антител 1-20), вводят в клетки *dhfr*<sup>-</sup> CHO посредством трансфекции, опосредованной фосфатом кальция. В конкретном варианте осуществления клетки *dhfr*<sup>-</sup> CHO являются клетками клеточной линии DG44, такими как DG44i (см., например, Derouaz et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 340 (4): 1069-77 (2006)). В пределах рекомбинантных векторов экспрессии каждый из генов тяжелой и легкой цепей антитела функционально связан с регуляторными энхансерными/промоторными элементами (например, полученными из SV40, CMV, аденовируса и т. п., такими как регуляторный элемент энхансера CMV/промотора AdMLP или регуляторный элемент энхансера SV40/промотора AdMLP) для обеспечения высоких уровней транскрипции указанных генов. Рекомбинантные векторы экспрессии также несут ген *DHFR*, который делает возможным отбор клеток CHO, которые были трансфицированы вектором, с использованием отбора/амплификации с помощью метотрексата. Отобранные трансформированные клетки-хозяева культивируют, чтобы сделать возможной экспрессию тяжелой и легкой цепей антитела, и выделяют антитело из культуральной среды.

Антитела также могут продуцироваться трансгенным животным. Например, в патенте США № 5849992 описан способ экспрессии антитела в молочной железе трансгенного млекопитающего. Конструируют

трансен, который содержит специфический по отношению к молоку промотор и нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющее интерес антитело и сигнальную последовательность для секреции. Молоко, продуцируемое самками таких трансгенных млекопитающих, содержит в себе представляющее интерес секретируемое антитело. Антитело может быть очищено от молока или использовано непосредственно для некоторых применений. Также представлены животные, содержащие одну или большее число нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

Представленные в данном документе антитела могут выделяться внутрь или наружу (например, в среду) клетки-хозяина и быть очищены до по существу чистых и гомогенных антител. Для выделения и очистки антител могут применяться способы выделения и очистки, обычно применяемые для очистки антител, и не ограниченные каким-либо конкретным способом. Антитела могут быть выделены и очищены посредством соответствующего выбора и комбинирования, например, колоночной хроматографии, фильтрации, ультрафильтрации, высаливания, осаждения растворителями, экстракции растворителями, дистилляции, иммунопреципитации, электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле, изоэлектрического фокусирования, диализа и перекристаллизации. Хроматография включает в себя, например, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, гель-фильтрацию, обращенно-фазовую хроматографию и адсорбционную хроматографию (Strategies for Protein Purification and Characterization:: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Хроматография может быть проведена с использованием жидкофазной хроматографии, такой как высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC) и жидкостная хроматография быстрого разрешения (FPLC). Колонки, применяемые для аффинной хроматографии, включают в себя колонку с белком А и колонку с белком G. Примеры колонок с использованием колонки с белком А включают в себя Hyper D, POROS и Sepharose FF (GE Healthcare Biosciences). Данное изобретение также включает в себя антитела, которые являются высокоочищенными в результате применения указанных способов очистки.

#### Характеризация антител

Интегрин-связывающие свойства антител, описанных в данном документе, могут быть измерены любым стандартным методом, например, одним или большим числом из следующих методов: ОСТЕТ<sup>®</sup>, поверхностный плазмонный резонанс (ППР), анализ BIACORE<sup>™</sup>, твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА), иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммунный анализ (РИА) и резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET).

Взаимодействие связывания белка, представляющего интерес (антитела против интегрина), и мишени (например, интегрина) может быть проанализировано с использованием систем ОСТЕТ<sup>®</sup>. В данном методе для определения белковых взаимодействий, специфичности связывания и картирования эпитопов используется один из нескольких вариантов приборов (ОСТЕТ<sup>®</sup> QK<sup>e</sup> и QK), произведенных компанией FortéBio. Системы ОСТЕТ<sup>®</sup> обеспечивают простой способ мониторинга связывания в реальном времени путем измерения изменений поляризованного света, который проходит по специальной насадке, а затем возвращается к датчику.

Взаимодействие связывания белка, представляющего интерес (антитела против интегрина), и мишени (например, интегрина) может быть проанализировано с использованием поверхностного плазмонного резонанса (ППР). ППР или анализ биомолекулярного взаимодействия (BIA) обнаруживает биспецифические взаимодействия в режиме реального времени, без маркировки любых взаимодействующих веществ.

Изменения массы на поверхности связывания (указывающие на событие связывания) чипа ВІА приводят к изменению показателя преломления света вблизи указанной поверхности (оптическое явление поверхностного плазмонного резонанса (ППР)). Изменения в преломлении генерируют обнаруживаемый сигнал, который измеряется как показатель реакций между биологическими молекулами в реальном времени.

5 Способы применения ППР описаны, например, в патенте США № 5641640; работах Raether (1988) *Surface Plasmons* Springer Verlag; Sjolander and Urbaniczky (1991) *Anal. Chem.* 63: 2338-2345; Szabo et al. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 699-705 и в онлайн-ресурсах, предоставляемых компанией ВІАcore International AB (Уппсала, Швеция). Информация, полученная с помощью ППР, может быть использована для обеспечения точной и количественной оценки равновесной константы диссоциации ( $K_d$ ) и кинетических параметров, включая  $K_{on}$  и  $K_{off}$ , связывания биомолекулы с мишенью.

Эпитопы также могут быть картированы напрямую путем оценки способности различных антител конкурировать друг с другом за связывание с  $\alpha v \beta 1$  человека,  $\alpha v \beta 6$  человека или одним или большего числа RGD-связывающих интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$ ,  $\alpha v \beta 8$ ,  $\alpha 5 \beta 1$ ,  $\alpha 8 \beta 1$  и  $\alpha IIb \beta 3$ , с помощью хроматографических методик ВІАCORE (Pharmacia ВІАtechnology Handbook, "Epitope Mapping", Section 6.3.2, (May 1994); см. также John et al. (1993) *J. Immunol. Methods*, 160: 191-198).

15 При использовании иммуноферментного анализа образец, содержащий антитело, например, супернатант культуры клеток, продуцирующих антитело, или очищенное антитело, помещают в планшет, покрытый антигеном. Добавляют вторичное антитело, меченное ферментом, таким как щелочная фосфатаза, инкубируют планшет и после промывки добавляют ферментный субстрат, такой как р-нитрофенилфосфат, и измеряют абсорбцию для оценки антигенсвязывающей активности.

Дополнительные общие рекомендации по оценке антител, например, касающиеся вестерн-блоттинга и анализов иммунопреципитации, можно найти в работе *Antibodies: A Laboratory Manual*, ed. by Harlow and Lane, Cold Spring Harbor press (1988))

## 25 Показания

### A. Антитела групп I-III

Интегрин  $\alpha v \beta 1$  на высоком уровне экспрессируется на активированных фибробластах и играет роль в активации трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ) и в стимулировании фиброобразования тканей (Reed et al., *Sci Transl Med.*, 7: 288 (2015)). Следовательно, любое из описанных в данном документе антител (например, антител группы I, II и III) может применяться для лечения или профилактики любых фиброзирующих заболеваний или патологических состояний, описанных в данном документе или известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе антитела полезны для лечения или профилактики таких заболеваний или патологических состояний по меньшей мере потому, что они блокируют активацию TGF $\beta$ .

35 Описанные в данном документе антитела могут применяться для лечения или профилактики фиброза органов, фиброза мягких тканей, фиброза суставов и соединительной ткани, а также мультиорганного или системного фиброза. Неограничивающие примеры фиброза органов включают в себя фиброз легких, фиброз почек, фиброз печени, фиброз органов головы и шеи, повреждение/фиброз спинного мозга, глиальные рубцы в головном мозге, фиброз глаз, фиброз сердца, фиброз кожи и фиброз костного мозга. Неограничивающие примеры фиброза мягких тканей включают в себя фиброз средостения и фиброз забрюшинного пространства. Неограничивающие примеры фиброза суставов и соединительной ткани включают в себя артрофиброз и

адгезивный капсулит. Неограничивающие примеры мультиорганного или системного фиброза включают в себя саркоидоз, системный склероз, амилоидоз, хирургический фиброз и нефрогенный системный фиброз.

Представленные в данном документе антитела могут применяться для лечения или профилактики фиброза легких, такого как следующие, но не ограничиваясь ими: идиопатический легочный фиброз (ИЛФ),  
5 выраженные обострения ИЛФ, вызванное радиацией поражение легких/фиброз, вызванный гриппом фиброз, вызванный коагуляцией фиброз, вызванный повреждением сосудов фиброз, обычная интерстициальная пневмония (ОИП), хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), вызванный блеомицином фиброз, астма (например, хроническая астма), силикоз, вызванный асбестом фиброз, острое поражение легких и острая дыхательная недостаточность (включая вызванные бактериальной пневмонией, травмой, вирусной  
10 пневмонией, искусственной вентиляцией легких, внелегочным сепсисом и аспирацией), легочный гистиоцитоз X и прогрессирующий массивный фиброз.

Представленные в данном документе антитела могут применяться для лечения или профилактики фиброза почек, такого как следующие, но не ограничиваясь ими: острое поражение почек, идиопатический нефротический синдром, идиопатический мембранопролиферативный гломерулонефрит, хронические  
15 нефропатии, связанные с травмой и/или фиброзом (например, волчанка, диабет, склеродермия, гломерулярный нефрит, фокальный сегментарный гломерулярный склероз, IgA-нефропатия, гипертензия, аллотрансплантат и болезнь Альпорта).

Представленные в данном документе антитела могут применяться для лечения или профилактики фиброза печени (такого как, но не ограничиваясь ими, острое поражение печени, фиброз, вызванный повреждением желчных протоков, и цирроз печени), фиброза кишечника (такого как, но не ограничиваясь  
20 ими, воспалительное заболевание кишечника и болезнь Крона), фиброза глаз (такого как, но не ограничиваясь ими, рубцевание роговицы, LASIX, трансплантация роговицы и трабекулэктомия), фиброза сердца (такого как, но не ограничиваясь ими, идиопатическая рестриктивная кардиомиопатия, фиброз предсердий, фиброз эндомиокарда и инфаркт миокарда), фиброза кожи (такого как, но не ограничиваясь ими, гипертрофическое  
25 рубцевание, вызванный ожогом фиброз, псориаз и келоид), а также фиброза костного мозга (такого как миелофиброз, но не ограничиваясь им).

Представленные в данном документе антитела могут применяться для лечения или профилактики неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), такой как жировая болезнь печени и неалкогольный  
стеатогепатит (НАСГ).

### 30 *B. Антитела группы II*

Интегрин  $\alpha\beta6$  может связываться с несколькими лигандами, включая фибронектин, тенасцин и ассоциированный с латентностью пептид-1 и -3 (LAP1 и LAP3) (278 N-концевых аминокислот латентной прекурсорной формы TGF- $\beta$ 1). Цитокин TGF- $\beta$  синтезируется в виде латентного комплекса, в котором N-концевой LAP нековалентно связан со зрелым активным C-концевым цитокином TGF- $\beta$ . Латентный комплекс  
35 TGF- $\beta$  не может связываться со своим рецептором и, следовательно, не является биологически активным до тех пор, пока не преобразуется в активную форму.  $\alpha\beta6$  связывает LAP1 и LAP3 посредством взаимодействия с мотивом аргинин-глицин-аспартат («RGD»), и это связывание  $\alpha\beta6$  с LAP1 или LAP3 приводит к активации латентной прекурсорной формы TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 3 в результате конформационного изменения латентного комплекса, что позволяет TGF- $\beta$  связываться со своим рецептором. Следовательно, повышенная экспрессия  
40  $\alpha\beta6$  может приводить к локальной активации TGF- $\beta$ , что в свою очередь активирует события ниже по каскаду.

Цитокин TGF- $\beta$  является плейотропным фактором роста, который регулирует пролиферацию, дифференциацию клеток и иммунные реакции. TGF- $\beta$  также играет роль в развитии рака. Известно, что TGF- $\beta$  обладает активностью супрессии и ингибирования роста опухолей, однако у многих опухолей развивается устойчивость к активности TGF- $\beta$  в супрессии роста. Было показано, что в развившихся опухолях экспрессия и активность TGF- $\beta$  способствуют выживанию, прогрессированию и метастазированию опухоли. Считается, что это опосредовано как аутокринными, так и паракринными эффектами в локальной опухолево-стромальной среде, включая влияние TGF- $\beta$  на иммунный надзор, ангиогенез и повышенное внутритканевое давление опухоли. В нескольких исследованиях были показаны противоопухолевые и противометастатические эффекты от ингибирования TGF- $\beta$ .

Интегрин  $\alpha\beta 6$  имеет относительно низкий уровень экспрессии на эпителиальных клетках в здоровых тканях, который значительно повышается во время развития, травмы и заживления ран. Экспрессия интегрина  $\alpha\beta 6$  повышается при раковых заболеваниях эпителиального происхождения, включая рак толстой кишки, плоскоклеточный рак, рак яичников и рак молочной железы.

Описанные в данном документе антитела, которые связываются как с интегрином  $\alpha\beta 1$ , так и с интегрином  $\alpha\beta 6$ , но не с другими интегринными (т. е. антитела группы II) могут применяться для защиты от повреждений эпителиальных и/или эндотелиальных клеток (например, повреждения эпителия альвеол). Описанные в данном документе антитела группы II могут применяться для блокирования взаимодействия рецептора  $\alpha\beta 6$  с RGD-содержащими лигандами, например, белками на поверхности вирусов, тем самым снижая или предотвращая вирусную инфекцию.

Описанные в данном документе антитела группы II могут применяться для лечения рака или раковых метастазов (включая рост и инвазию опухоли), таких как, эпителиальные раковые заболевания, но не ограничиваясь ими. Неограничивающие примеры эпителиальных раковых заболеваний включают в себя плоскоклеточную карциному, например, органов головы и шеи (включая ротовую полость, гортань, глотку, пищевод), рак молочной железы, легких, предстательной железы, шейки матки, толстой кишки, поджелудочной железы, кожи (базально-клеточный рак), яичников и почек (например, почечно-клеточный рак). Описанные в данном документе антитела группы II могут также применяться для лечения опухолей головного мозга и центральной нервной системы (например, глиобластомы), офтальмологических заболеваний (например, макулярной дегенерации и возрастной макулярной дегенерации), остеопороза, а также заболеваний почек, таких как, но не ограничиваясь ими, хроническое поражение канальцев, хроническое заболевание почек, (хронический) интерстициальный фиброз, атрофия канальцев и хроническая дисфункция аллотрансплантата у пациентов, перенесших трансплантацию почки.

Данное изобретение включает в себя способы лечения или профилактики метастатического рака путем выявления прединвазивных поражений или карцином у пациентов и лечения пациента для устранения прединвазивного поражения до того, как оно получит возможность развиваться в инвазивную форму. Такие способы включают в себя, например, (а) получение образца ткани, который предположительно содержит рак или прединвазивное поражение, и образца ткани, который не содержит рак или прединвазивное поражение (предпочтительно из той же ткани или органа, которые предположительно содержат рак или прединвазивное поражение); (б) приведение указанных образцов ткани в контакт с одним или большим числом  $\alpha\beta 6$ -связывающих лигандов, таких как любые антитела группы II, описанные в данном документе, в условиях, благоприятствующих связыванию указанных одного или большего числа  $\alpha\beta 6$ -связывающих лигандов с интегринными  $\alpha\beta 6$  в ткани, где бы они ни присутствовали; и (с) определение уровня или паттерна связывания

указанного (-ых)  $\alpha\beta 6$ -связывающего (-их) лиганда (-ов) с указанной тканью, при этом повышение локального связывания указанного  $\alpha\beta 6$ -связывающего лиганда в миоэпителии, окружающем гиперплазию (например, опухоль), по сравнению со связыванием в самой гиперплазии (или ее клетках), или повышение уровня связывания указанного  $\alpha\beta 6$ -связывающего лиганда в указанном образце ткани, содержащем раковое или прединвазивное поражение, по сравнению со связыванием в образце нераковой ткани (или ее клетках), указывает на карциному, которая с повышенной вероятностью станет инвазивной и потенциально даст метастазы. В других связанных вариантах осуществления в данном изобретении предусмотрены способы замедления или предотвращения прогрессирования предметастатической или прединвазивной опухоли до метастатической или инвазивной опухоли у пациента, включающие в себя введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества одного или большего числа лигандов, которые связываются с одной или большим числом субъединиц интегрина  $\alpha\beta 6$  на одной или большем числе клеток в предметастатической или прединвазивной опухоли, при этом связывание указанного лиганда с интегрином приводит к замедлению или предотвращению инвазии клеток предметастатического или прединвазивного рака в области тканей, окружающие первичную опухоль. В других вариантах осуществления способы согласно данному изобретению подходят для удаления остаточных опухолевых клеток, например, остаточных метастатических клеток, после удаления, лечения или устранения опухоли с помощью другого подхода. Например, такие способы могут применяться для устранения остаточных опухолевых клеток или метастатических клеток, которые могут остаться у пациента после хирургического удаления опухоли или устранения опухоли такими методами, как облучение, химиотерапия и т. п. В таких лечебных схемах способы согласно данному изобретению могут включать в себя введение  $\alpha\beta 6$ -связывающих антител пациенту до, во время и/или после хирургической, радиологической и/или химиотерапевтической абляции опухоли.

### *С. Антитела группы III*

Описанные в данном документе антитела, которые связываются с  $\alpha\beta 1$  и с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 11\beta 3$  (т. е. антитела группы III) могут применяться для лечения рака или метастазов рака, таких как, но не ограничиваясь ими, солидные опухоли (например, рак поджелудочной железы или рак молочной железы). Описанные в данном документе антитела группы III могут применяться для лечения рака яичников, колоректального рака и рака предстательной железы, с метастазами в кости или без них, а также для лечения почечно-клеточного рака, рака брюшины, опухолей головного мозга и центральной нервной системы, и меланомы. Описанные в данном документе антитела группы III могут применяться для лечения офтальмологических заболеваний, таких как следующие, но не ограничиваясь ими: макулярная дегенерация, возрастная макулярная дегенерация (ВМД), влажная возрастная макулярная дегенерация, диабетический макулярный отек и диабетическая ретинопатия. Описанные в данном документе антитела группы III также могут применяться для лечения острого коронарного синдрома (ОКС), аутоиммунных заболеваний и остеопороза. Неограничивающие примеры аутоиммунных заболеваний включают в себя: ревматоидный артрит, псориаз, волчанку, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, синдром Гийена – Барре, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, миастению гравис и васкулит. Описанные в данном документе антитела группы III могут быть полезны в качестве антитромботического средства и могут применяться, например, во время чрескожного коронарного вмешательства (ангиопластика с установкой стента или без нее).

Эффективность антител согласно данному изобретению может быть оценена в различных животных

моделях. Мышиные модели фиброза легких включают в себя индуцированный блеомицином фиброз легких (Pittet et al., *J. Clin. Invest.*, 107 (12): 1537-1544 (2001); and Munger et al., *Cell*, 96: 319-328 (1999)) и индуцированный облучением фиброз легких (Franko et al., *Rad. Res.*, 140: 347-355 (1994)). Мышиные модели фиброза почек включают в себя мышей COL4A3 -/- (см., например, Cosgrove et al., *Amer. J. Path.*, 157: 1649-1659 (2000), мышей с индуцированным адриамицином повреждением (Wang et al., *Kidney International*, 58: 1797-1804 (2000); Deman et al., *Nephrol Dial Transplant*, 16: 147-150 (2001)), мышей db/db (Ziyadeh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:8015-8020 (2000)) и мышей с односторонней обструкцией мочеточника (Fogo et al., *Lab Investigation*, 81: 189A (2001); и Fogo et al., *Journal of the American Society of Nephrology*, 12: 819 A (2001)).

Описанные в данном документе антитела против  $\alpha\beta6$  могут быть оценены на предмет их способности ингибировать рост, прогрессирование и метастазирование опухоли в стандартных моделях роста опухоли и метастазирования *in vivo*. См., например, Rockwell et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 49: 735 (1972); Guy et al., *Mol. Cell Biol.*, 12: 954 (1992); Wyckoff et al., *Cancer Res.*, 60: 2504 (2000); и Oft et al., *Curr. Biol.*, 8: 1243 (1998).

Эффективность лечения может быть измерена с помощью ряда доступных диагностических инструментов, включая физическое обследование, анализы крови, измерение протеинурии, уровней креатинина и клиренса креатинина, исследования функции легких, измерение уровня азота мочевины в плазме крови (BUN), наблюдение и оценку рубцовых или фиброзных поражений, отложений внеклеточного матрикса, такого как коллаген, актин гладкой мускулатуры и фибронектин, исследования функции почек, ультразвуковое исследование, магнитно-резонансную томографию (МРТ) и компьютерную томографию.

#### Фармацевтические композиции

Описанные в данном документе антитела против интегрина могут быть составлены в виде фармацевтической композиции для введения субъекту, например, для лечения заболевания или патологического состояния, описанных в данном документе. Как правило, фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель. В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Указанная композиция может содержать фармацевтически приемлемую соль, например, соль добавления кислоты или соль с добавления основания (см., например, Berge, S.M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19).

Составление фармацевтических композиций относится к хорошо известной области техники, которая дополнительно описана, например, в работах Gennaro (ed.), *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20<sup>th</sup> ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7<sup>th</sup> Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); and Kibbe (ed.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association*, 3<sup>rd</sup> ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

Фармацевтические композиции могут пребывать в различных формах. Эти формы включают в себя, например, жидкие, полутвердые и твердые дозированные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма может зависеть от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Как правило, композиции для агентов, описанных в данном документе, пребывают в форме растворов для инъекций или растворов для инфузий.

Такие композиции могут вводиться парентеральным способом (например, внутривенной, подкожной, внутрибрюшинной или внутримышечной инъекцией). В одном варианте осуществления композиция указанных антител вводится внутривенно. В другом варианте осуществления композиция указанных антител вводится подкожно. Фразы «парентеральное введение» и «введенный парентерально», употребляемые в  
5  
данном документе, означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают в себя следующее, но не ограничиваются им: внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекции и инфузии.  
10

Указанная композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для стабильного хранения в высокой концентрации. Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения агента, описанного в данном документе, в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией  
15  
ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовят путем включения агента, описанного в данном документе, в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций, предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная  
20  
сушка, которые приводят к получению порошка агента, описанного в данном документе, плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерильно профильтрованного раствора.

### Введение

Описанное в данном документе антитело может вводиться субъекту, например, субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, например, различными способами. Для многих применений способ введения является одним из следующих: внутривенная инъекция или инфузия (в/в), подкожная инъекция (п/к),  
25  
внутрибрюшинное введение (в/бр) или внутримышечная инъекция (в/м). Также возможно применение внутрисуставной доставки. Также могут применяться другие способы внутрибрюшинной доставки. Примеры таких способов включают в себя: внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, транстрахеальную, подкожную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекции. В  
30  
некоторых случаях доставка может быть пероральной.

Путь и/или способ введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента также могут быть адаптированы к индивидуальному случаю, например, путем наблюдения за субъектом, например, с  
35  
использованием томографического изображения, например, для визуализации опухоли.

Если субъект подвержен риску развития заболевания или патологического состояния, описанных в данном документе, антитело может вводиться до полного начала заболевания или патологического состояния, например, в качестве профилактической меры. Длительность такого профилактического воздействия может  
40  
составлять одну дозу антитела или воздействие может продолжаться (например, множественные дозы).

Например, субъект, подверженный риску указанного заболевания или имеющий предрасположенность к  
указанному заболеванию, может проходить лечение указанным антителом в течение дней, недель, месяцев

или даже лет, чтобы предотвратить возникновение или обострение указанного заболевания.

Фармацевтическая композиция может включать в себя «терапевтически эффективное количество» агента, описанного в данном документе. Такие эффективные количества могут быть определены на основании действия вводимого агента или комбинаторного эффекта агентов, если применяют больше чем один агент.

5 Терапевтически эффективное количество агента, описанного в данном документе, может варьировать в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст, пол и масса тела индивидуума, и способность соединения вызывать желаемый ответ у индивидуума, например, улучшение по меньшей мере одного параметра заболевания или патологического состояния, или ослабление по меньшей мере одного симптома заболевания или патологического состояния. Терапевтически эффективное количество также  
10 является таким, в котором любые токсичные или вредные эффекты композиции перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами.

#### Устройства и наборы для терапии

15 Фармацевтические композиции, которые включают описанное в данном документе антитело, могут вводиться с помощью медицинского устройства. Такое устройство может быть сконструировано с такими характеристиками, как портативность, хранение при комнатной температуре и простота использования, чтобы его можно было использовать в чрезвычайных ситуациях, например, неподготовленным субъектом или персоналом службы экстренной помощи в полевых условиях, вне медицинских учреждений и без другого медицинского оборудования. Такое устройство может включать в себя, например, один или большее число  
20 отсеков для хранения фармацевтических препаратов, которые включают в себя указанное антитело, и может быть сконструировано для доставки одной или большего числа единичных доз указанного антитела. Такое устройство может быть дополнительно сконструировано для введения второго агента либо в виде одной фармацевтической композиции, которая также включает антитело, описанное в данном документе, либо в виде двух отдельных фармацевтических композиций.

25 Указанная фармацевтическая композиция может вводиться с помощью шприца. Например, указанная фармацевтическую композиция также может вводиться посредством устройства для подкожных инъекций без иглы, такого как устройства, описанные в US 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Примеры хорошо известных имплантов и модулей включают в себя: US 4487603, в котором раскрывается имплантируемая микроинфузионная помпа для введения медицинского препарата с  
30 контролируемой скоростью; US 4486194, в котором раскрывается терапевтическое устройство для введения медицинских препаратов через кожу; US 4447233, в котором раскрывается помпа для инфузии медицинских препаратов для их доставки с точной скоростью инфузии; US 4447224, в котором раскрывается имплантируемый инфузионный аппарат с регулируемым потоком для непрерывной доставки лекарственного препарата; US 4439196, в котором раскрывается осмотическая система доставки лекарственного препарата,  
35 имеющая многокамерные отсеки; и US 4475196, в котором раскрывается осмотическая система доставки лекарственного препарата. Также известны многие другие устройства, импланты, системы доставки и модули.

Описанное в данном документе антитело может быть предоставлено в наборе. В одном варианте осуществления такой набор включает в себя: (а) контейнер, который содержит композицию, включающую в  
40 себя описанное в данном документе антитело, и, необязательно, (b) информационный материал. Указанный информационный материал может быть описательным, инструктивным, маркетинговым или другим

материалом, относящимся к описанным в данном документе способам и/или к применению агентов для терапевтической пользы.

В одном варианте осуществления набор также включает в себя второй агент для лечения заболевания или патологического состояния, описанных в данном документе. Например, набор включает в себя первый контейнер, который содержит композицию, включающую описанное в данном документе антитело, и второй контейнер, который содержит указанный второй агент.

Информационный материал наборов не ограничен по форме. В одном варианте осуществления информационный материал может содержать информацию о производстве соединения, молекулярной массе соединения, концентрации, дате истечения срока годности, информации о партии или месте производства и т. д. В одном варианте осуществления информационный материал касается способов введения описанного в данном документе антитела, например, подходящего способа введения (например, описанного в данном документе способе введения), для лечения субъекта, который страдал от или подвергается риску заболевания или патологического состояния, описанных в данном документе. Информация может быть предоставлена в различных форматах, включая печатный текст, машиночитаемые материалы, видеозапись или аудиозапись, или информацию, которая содержит ссылку или адрес на основной материал, например, в сети Интернет.

В дополнение к указанному антителу композиция в наборе может содержать другие ингредиенты, такие как растворитель или буфер, стабилизатор или консервант. Указанное антитело может быть предоставлено в любой форме, например, в жидкой, высушенной или лиофилизированной форме, предпочтительно – по существу чистой и/или стерильной. Когда агенты предоставляются в жидком растворе, такой жидкий раствор предпочтительно представляет собой водный раствор. Когда агенты предоставляются в высушенном виде, восстановление обычно происходит путем добавления подходящего растворителя. Растворитель, например, стерильная вода или буфер, может быть дополнительно включен в набор.

Набор может содержать один или большее число контейнеров для композиции или композиций, содержащей (-их) указанные агенты. В некоторых вариантах осуществления набор содержит отдельные контейнеры, разделители или отсеки для композиции и информационного материала. Например, композиция может содержаться во флаконе, ампуле или шприце, а информационный материал может содержаться в пластиковом рукаве или пакете. В других вариантах осуществления отдельные элементы набора содержатся в одном неразделенном контейнере. Например, композиция содержится во флаконе, ампуле или шприце, к которым прикреплен информационный материал в виде этикетки. В некоторых вариантах осуществления набор включает в себя множество (например, упаковку) отдельных контейнеров, каждый из которых содержит одну или большее число единичных лекарственных форм (например, лекарственную форму, описанную в данном документе) указанных агентов. Контейнеры могут содержать комбинированную единичную дозу, например, единичную форму, которая содержит как антитело, описанное в данном документе, так и второй агент, например, в желательном соотношении. Например, набор содержит множество шприцев, ампул, пакетов из фольги, блистерных упаковок или медицинских устройств, например, каждое из которых содержит одну комбинированную единичную дозу. Контейнеры наборов могут быть воздухонепроницаемыми, водонепроницаемыми (например, непроницаемыми для влаги или испарения) и/или светонепроницаемыми. Набор необязательно содержит устройство, подходящее для введения указанной композиции, например, шприц или другое подходящее устройство доставки. Указанное устройство может быть предварительно заполнено одним или обоими указанными агентами, или может быть пустым, но пригодным для заполнения.

Способы отбора представляющего интерес антитела против интегрина

В некоторых аспектах данного изобретения представлены способы отбора, обнаружения или выделения представляющего интерес антитела с использованием любого из описанных в данном документе антител против интегрина. Представляющее интерес антитело может представлять собой антитела, которые связываются с  $\alpha\nu\beta 1$ -интегрином, но больше ни с каким другим интегрином (например, другими  $\alpha\nu$ - или  $\beta 1$ -содержащими интегринными, или интегринными семейства RGD), которые связываются как с  $\alpha\nu\beta 1$ -интегрином, так и с  $\alpha\nu\beta 6$ -интегрином, но больше ни с какими другими интегринными, или которые связываются с  $\alpha\nu\beta 1$ -интегрином и с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ ,  $\alpha\nu\beta 6$ ,  $\alpha\nu\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha\Pi\beta 3$ .

В качестве примера, для отбора представляющих интерес антител против интегрина может проводиться направленный процесс отбора с использованием направляющих антител, которые могут представлять собой описанные в данном документе антитела, которые связываются с  $\alpha\nu\beta 1$ -интегрином, но больше ни с каким другим интегрином (например, другими  $\alpha\nu$ - или  $\beta 1$ -содержащими интегринными, или интегринными семейства RGD), такие как иллюстративные антитела 1-10. Например, может быть предоставлен меченый рекомбинантный или очищенный  $\alpha\nu\beta 1$ -интегрин (например, полипептид или полипептиды, содержащий (-е) внеклеточные домены  $\alpha\nu$  и  $\beta 1$ ) и прокариотическая или эукариотическая (например, дрожжи) библиотека экспрессии антител. Из указанной библиотеки экспрессии антител могут быть отобраны клоны, которые проявляют сниженное связывание с меченым антигеном при добавлении направляющего антитела, клоны, которые обогащены представляющими интерес антителами. Дополнительные описания процесса направляемого отбора можно найти, например, в работах Cherf and Cochran, *Methods Mol Biol.* 1319: 155-75, 2015; Xu et al. *Protein Eng Des Sel.* 26 (10): 663-70, 2013; и Mann et al. *ACS Chem Biol.* 8 (3): 608-16, 2013. В некоторых случаях любое одно или большее число из иллюстративных антител 11-14 и 15-20 также могут быть использованы в качестве направляющих антител для отбора, обнаружения или выделения представляющего интерес антитела (например, антител, которые связываются с  $\alpha\nu\beta 1$ -интегрином, но больше ни с каким другим интегрином (например, другими  $\alpha\nu$ - или  $\beta 1$ -содержащими интегринными, или интегринными семейства RGD), которые связываются как с  $\alpha\nu\beta 1$ -интегрином, так и с  $\alpha\nu\beta 6$ -интегрином, но больше ни с какими другими интегринными, или которые связываются с  $\alpha\nu\beta 1$ -интегрином и с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ ,  $\alpha\nu\beta 6$ ,  $\alpha\nu\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha\Pi\beta 3$ ).

Для отбора антител, которые связываются с  $\alpha\nu\beta 1$ -интегрином, но больше ни с каким другим интегрином (например, другими  $\alpha\nu$ - или  $\beta 1$ -содержащими интегринными, или интегринными семейства RGD), например, указанные способы могут дополнительно включать в себя истощение антител, которые связываются с нежелательными интегринными, например, с  $\alpha\nu$ - или  $\beta 1$ -содержащими интегринными, или интегринными семейства RGD, включая  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ ,  $\alpha\nu\beta 6$ ,  $\alpha\nu\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha\Pi\beta 3$ . Указанные способы могут также включать в себя этапы положительного отбора с использованием представляющего интерес интегринмишени –  $\alpha\nu\beta 1$ -интегрин. Антитела, которые связываются с  $\alpha\nu\beta 1$ - и  $\alpha\nu\beta 6$ -интегринными, но больше ни с какими другими интегринными, могут быть одинаково отобраны путем истощения антител, которые связываются с интегринными, отличными от  $\alpha\nu\beta 1$ - и  $\alpha\nu\beta 6$ -интегринов, и/или путем выполнения положительного отбора с использованием  $\alpha\nu\beta 1$ - и  $\alpha\nu\beta 6$ -интегринов. Такие подходы также применяются к отбору антител, которые связываются с  $\alpha\nu\beta 1$ -интегрином и с одним или большим числом интегринов,

выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\nu\beta3$ ,  $\alpha\nu\beta5$ ,  $\alpha\nu\beta6$ ,  $\alpha\nu\beta8$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha8\beta1$  и  $\alpha\Pi\beta3$ .

Антитела, обогащенные в одном или большем числе из указанных выше этапов, также могут быть подвергнуты созреванию аффинности для повышения их аффинности и специфичности к целевому интегринам, создавая библиотеки с использованием способов оптимизации аффинности, известных в данной области техники (например, перетасовка легких цепей или направленный мутагенез H-CDR1/H-CDR-2).

## ПРИМЕРЫ

Следующие ниже примеры представлены для лучшей иллюстрации заявляемого изобретения и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие объем данного изобретения. В той мере, в какой упоминаются конкретные материалы, это делается исключительно в целях иллюстрации и не предназначено для ограничения данного изобретения. Специалист в данной области техники может разработать эквивалентные средства или реагенты без использования изобретательских способностей и без выхода за рамки объема данного изобретения.

### Пример 1: схема отбора и получения антител

Известно, что  $\alpha\nu\beta1$ -интегрин связывается с несколькими белками внеклеточного матрикса. Гетеродимерный комплекс представляет собой комбинацию альфа-субъединицы  $\alpha\nu$  и бета-субъединицы  $\beta1$  (SEQ ID NO: 1 и 2).  $\alpha\nu$ -субъединица способна к функциональному сопряжению с четырьмя дополнительными бета-субъединицами:  $\beta3$ ,  $\beta5$ ,  $\beta6$  и  $\beta8$ .  $\beta1$ -субъединица способна к функциональному сопряжению с одиннадцатью дополнительными альфа-субъединицами:  $\alpha1$ ,  $\alpha2$ ,  $\alpha3$ ,  $\alpha4$ ,  $\alpha5$ ,  $\alpha6$ ,  $\alpha7$ ,  $\alpha8$ ,  $\alpha9$ ,  $\alpha10$ ,  $\alpha11$  (Hynes R O, *Cell*, 110 (6): 673-87 (2002)).

$\alpha\nu\beta1$ -интегрин рекомбинантно экспрессировали и очищали в соответствии со способами, известными в данной области техники. В дополнение к этому  $\alpha\nu\beta3$ -,  $\alpha\nu\beta5$ -,  $\alpha\nu\beta6$ -,  $\alpha\nu\beta8$ -,  $\alpha4\beta1$ -,  $\alpha5\beta1$ - и  $\alpha8\beta1$ -интегрины рекомбинантно экспрессировали и очищали в соответствии со способами, известными в данной области техники. В данном документе описаны три различные группы антител: антитела, которые связываются с интегрином  $\alpha\nu\beta1$ , но ни с каким другим интегрином (например, другими  $\alpha\nu$ - или  $\beta1$ -содержащими интегринными); антитела, которые связываются с  $\alpha\nu\beta1$ - и  $\alpha\nu\beta6$ -интегринными, но ни с какими другими интегринными; и антитела, которые связываются с  $\alpha\nu\beta1$  и одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\nu\beta3$ ,  $\alpha\nu\beta5$ ,  $\alpha\nu\beta6$ ,  $\alpha\nu\beta8$ ,  $\alpha4\beta1$ ,  $\alpha5\beta1$  и  $\alpha8\beta1$ .

Для получения указанных групп антител библиотеки экспрессии Adimab подвергали скринингу в соответствии со способами, раскрытыми в патентных публикациях США 20100056386 и 20090181855. Осуществляли многократные повторяющиеся циклы давления отбора в направлении представляющего интерес антигена  $\alpha\nu\beta1$  (SEQ ID NO: 1 и 2) и давления отбора для уменьшения связывания с нежелательными антигенами  $\alpha\nu\beta3$ ,  $\alpha\nu\beta5$ ,  $\alpha\nu\beta6$ ,  $\alpha\nu\beta8$ ,  $\alpha4\beta1$ ,  $\alpha5\beta1$  и  $\alpha8\beta1$ . При отборах, в которых желательно связывание с  $\alpha\nu\beta1$  и  $\alpha\nu\beta6$ , вводили повторяющиеся циклы давления отбора в направлении  $\alpha\nu\beta6$  и исключали циклы для уменьшения связывания с  $\alpha\nu\beta6$ . Также могут быть разработаны отборы для направления к представляющему интерес эпиптопу с использованием направляющих белков (т. е. mAb, Fab или лигандов). Отборы проводили в присутствии и отсутствии катионов, включая кальций, магний и марганец. После завершения отборов колонии секвенировали для идентификации уникальных клонов с использованием методики, известной в данной области техники. После четырех производственных циклов более 2500 антител были экспрессированы

и очищены на смоле белка А из дрожжей с использованием способов, известных в данной области техники. Общая схема сортировки  $\alpha\nu\beta 1$ -специфических,  $\alpha\nu\beta 1/\alpha\nu\beta 6$ -специфических и специфических в отношении  $\alpha\nu\beta 1$  плюс одно или большее число интегрин-связывающих антител показана на **фиг. 1**.

5 Также проводили оптимизацию антител для повышения аффинности определенных антител в отношении  $\alpha\nu\beta 1$ , а также для точной настройки интегринспецифичности. Библиотеки антител создавали с использованием способов оптимизации аффинности, известных в данной области техники (т. е. перетасовки легких цепей и направленного мутагенеза Н-CDR1/Н-CDR-2). Применялись многократные повторяющиеся циклы давления отбора в отношении представляющего интерес антигена с использованием уменьшающихся концентраций рекомбинантного белка  $\alpha\nu\beta 1$ . Осуществляли давление отбора для уменьшения связывания с  
10 нежелательными антигенами  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ ,  $\alpha\nu\beta 6$ ,  $\alpha\nu\beta 8$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  и  $\alpha 8\beta 1$ . После завершения отборов колонии секвенировали для идентификации уникальных клонов с использованием способов, известных в данной области техники. После производственных циклов по оптимизации антител более 500 антител были экспрессированы и очищены на смоле белка А из дрожжей с использованием способов, известных в данной области техники.

15 Данный анализ привел к идентификации двадцати антител. Аминокислотные последовательности областей CDR и переменных областей этих антител представлены в данном документе.

### **Пример 2: определение кинетики связывания и интегринспецифичности**

После производственных циклов 1-3 проводили первичный скрининг антител на предмет положительного связывания с  $\alpha\nu\beta 1$  в присутствии или отсутствии катионов. Затем проводили скрининг положительных  
20 антител на предмет связывания с другими  $\alpha\nu$ -содержащими и  $\beta 1$ -содержащими интегринами. Данный скрининговый этап выполняли для того, чтобы сфокусировать будущую характеристику на антителах, которые распознают комбинацию  $\alpha\nu$ - и  $\beta 1$ -субъединиц, и исключить антитела, которые распознают только  $\alpha\nu$ -субъединицу или только  $\beta 1$ -субъединицу. Данный этап также позволяет стратифицировать антитела на основе предпочтения связывания с RGD-связывающими интегринами (т. е.  $\alpha\nu\beta 1$ ,  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ ,  $\alpha\nu\beta 6$ ,  $\alpha\nu\beta 8$ ,  
25  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha II\beta 3$ ) и не RGD-связывающими  $\beta 1$ -содержащими интегринами (т. е.  $\alpha 4\beta 1$ ).

Проводили скрининг антител на предмет связывания с антигеном-мишенью с помощью биослойной интерферометрии (BLI). BLI проводили на приборах Octet RED384 и Octet HTX производства ForteBio в соответствии со стандартными процедурами. Было классифицировано подмножество антител на основе их  
30 специфичности для последующего скрининга в дополнительных экспериментах.

Примеры наблюдаемой кинетики связывания для  $\alpha\nu\beta 1$ -специфических, неспецифических и частично селективных антител показаны на **фиг. 2А-К** и **фиг. 3А-Е**. В дополнение к этому, аффинность моновалентного связывания для рекомбинантного  $\alpha\nu\beta 1$  показана на **фиг. 4А-Ж**. Это включает в себя антитела из трех первоначальных производственных циклов и последующих производственных циклов по оптимизации  
35 аффинности. Скрининг моновалентной аффинности после созревания аффинности позволил отобрать клоны с наивысшей аффинностью из циклов оптимизации для дальнейшей характеристики.

Примеры антител, которые проявляют специфичность к  $\alpha\nu\beta 1$ , включают в себя иллюстративное антитело 1 и иллюстративное антитело 2. Примеры антител, которые являются частично селективными, включают в себя иллюстративное антитело 15 и иллюстративное антитело 16. Антитела с более высокой аффинностью,  
40 отобранные после созревания аффинности, включают в себя иллюстративное антитело 4 и иллюстративное

антитело 5.

### Пример 3: определение связывания на клеточной поверхности и интегринспецифичности

Стабильно трансфицированные клетки, экспрессирующие  $\alpha\nu\beta 1$ ,  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ ,  $\alpha\nu\beta 6$ ,  $\alpha\nu\beta 8$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  и  $\alpha 8\beta 1$ ,  
5 получали с помощью способов, известных в данной области техники.

После производственных циклов 1-3 проводили первичный скрининг антител с помощью Octet RED384 и Octet HTX. Было отобрано подмножество антител для дополнительного скрининга специфичности и измерения аффинности к трансфицированным клеткам и нетрансфицированным клеткам. После производственного цикла 4 проводили скрининг антител непосредственно на стабильно трансфицированных  
10 клетках, экспрессирующих  $\alpha\nu\beta 1$ . Затем проводили скрининг положительных антител на предмет связывания с другими  $\alpha\nu$ -содержащими и  $\beta 1$ -содержащими стабильно трансфицированными клетками. Данный скрининговый этап выполняли для того, чтобы сфокусировать будущую характеристику на антителах, которые распознают комбинацию  $\alpha\nu$ - и  $\beta 1$ -субъединиц, и исключить антитела, которые распознают только  $\alpha\nu$ -субъединицу или только  $\beta 1$ -субъединицу. Данный этап также позволяет стратифицировать антитела на  
15 основе предпочтения связывания с RGD-связывающими интегринами (т. е.  $\alpha\nu\beta 1$ ,  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ ,  $\alpha\nu\beta 6$ ,  $\alpha\nu\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha \text{IIb}\beta 3$ ) и не RGD-связывающими  $\beta 1$ -содержащими интегринами (т. е.  $\alpha 4\beta 1$ ).

После первичного скрининга на предмет связывания с клетками одной-трех концентраций антител проводили исследование концентрационных серий из 6 или 11 концентраций антител на нескольких  $\alpha\nu$ -содержащих и  $\beta 1$ -содержащих клеточных линиях.

После сбора клеток было подтверждено, что их жизнеспособность превышает 90%. Клетки промывали в соответствующем буфере для анализа три раза путем осаждения при 1500 об/мин в течение 3 минут и выливания супернатанта. Буфером для анализа в данном эксперименте был TBS, содержащий 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА) и дополненный либо 1 mM Ca + 1 mM Mg, либо 1 mM Mn. Затем клетки ресуспендировали в буфере для анализа в концентрации  $1,0 - 1,5 \times 10^6$  клеток/мл и переносили в лунки 96-  
25 луночного планшета для анализа (Corning 3799) в али квотах по 50 мкл. Затем планшеты центрифугировали при 2000 об/мин в течение 3 минут для осаждения клеток и удаляли супернатант. Клетки ресуспендировали в 100 мкл образца антител и инкубировали на льду в течение 45-60 минут. Более низкие концентрации антител требовали более длительного времени инкубации.

Планшеты трижды промывали в буфере для анализа объемом 150 мкл путем осаждения при 2000 об/мин в течение 3 минут и последующего удаления супернатанта. Затем клетки ресуспендировали в 50 мкл вторичного реагента – конъюгированного с фикоэритрином антитела козы против Fab человека – и инкубировали на льду в темноте в течение 30 минут. Планшеты трижды промывали в буфере для анализа объемом 150 мкл путем осаждения при 2000 об/мин в течение 3 минут и последующего удаления супернатанта. Затем клетки ресуспендировали в 200 мкл буфера для анализа + 1 % полиформальдегида (ПФА) в течение 30 минут на льду для фиксации клеток. Клетки осаждали для удаления ПФА, а затем ресуспендировали в 150 мкл буфера для анализа.

Популяции клеток анализировали на проточном цитометре BD FACSCALIBUR.

Примеры наблюдаемых титров связывания для  $\alpha\nu\beta 1$ -специфических и частично селективных антител показаны на **фиг. 5А-Е** и **фиг. 6А-Ж**. Это включает в себя антитела из четырех первоначальных  
40 производственных циклов и последующих производственных циклов по оптимизации аффинности. Бивалентная аффинность (т. е. EC50) связывания с поверхностью клетки для подмножества RGD-

связывающих интегринов обобщенно представлена в таблице 1.

**ТАБЛИЦА 1**

Антитело (Ат)	EC50 $\alpha\nu\beta1$ (нМ)	EC50 $\alpha\nu\beta3$ (нМ)	EC50 $\alpha\nu\beta5$ (нМ)	EC50 $\alpha\nu\beta6$ (нМ)	EC50 $\alpha\nu\beta8$ (нМ)	EC50 $\alpha8\beta1$ (нМ)
Пр. Ат 5	4,5	-	-	-	-	-
Пр. Ат 4	4,9	-	-	-	-	-
Пр. Ат 19	2,8	-	-	-	2,8	-
Пр. Ат 17	1,4	3,3	-	>100	>100	>100
Пр. Ат 18	2,0	13	11	16	10	-
Пр. Ат 11	1,9	-	н.о.	16	-	-
Пр. Ат 6	0,8	-	н.о.	связывание	-	-
Пр. Ат 12	1,6	-	н.о.	17	-	-
Пр. Ат 13	0,6	-	н.о.	связывание	-	-
Пр. Ат 20	0,4	-	н.о.	-	связывание	н.о.
Пр. Ат 7	1,2	-	н.о.	связывание	-	-
Пр. Ат 14	0,8	-	н.о.	связывание	-	-
Пр. Ат 8	6,3	-	н.о.	-	-	-
Пр. Ат 9	0,9	-	н.о.	-	-	-
Пр. Ат 10	1,5	-	н.о.	-	-	-

Сокращения: н.о. = не определено; связывание = наблюдалось слабое связывание, но вписывание в модель было неполным, и рассчитать EC50 было невозможно

- 5 Примеры антител, которые проявляют специфичность к  $\alpha\nu\beta1$ , включают в себя иллюстративное антитело 5, иллюстративное антитело 4, иллюстративное антитело 7 и иллюстративное антитело 8. Примеры антител, которые проявляют специфичность и к  $\alpha\nu\beta1$ , и к  $\alpha\nu\beta6$ , включают в себя иллюстративное антитело 11, иллюстративное антитело 12 и иллюстративное антитело 14. Примеры антител, которые являются частично селективными (т. е. связываются с  $\alpha\nu\beta1$ -интегрином и с одним или большим числом интегринов, выбранных
- 10 из группы, состоящей из  $\alpha\nu\beta3$ ,  $\alpha\nu\beta5$ ,  $\alpha\nu\beta6$ ,  $\alpha\nu\beta8$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha8\beta1$  и  $\alpha\PiВ\beta3$ ), включают в себя иллюстративное антитело 19 и иллюстративное антитело 17.

**Пример 4:  $\alpha\nu\beta1$ -ингибирование адгезии ассоциированного с латентностью белка**

- 15 После определения специфических и частично селективных антител указанные антитела были протестированы в анализе адгезии связанного с латентностью пептида (LAP) для подтверждения способности блокировать взаимодействие интегрин/лиганд, чтобы сфокусироваться на антителах, которые могут нарушать функциональную биологическую активность. LAP является одним из многих лигандов для гетеродимера  $\alpha\nu\beta1$ , а также для других гетеродимеров интегрина, включая  $\alpha\nu\beta6$  и  $\alpha\nu\beta8$ .

- 20 96-луночный микротитровальный планшет (Costar 3369) покрывали белком LAP (R&D Systems, № по каталогу: 246-LP) объемом 100 мкл/лунка в концентрации 10 мкг/мл, разведенным в 50 мМ бикарбонате натрия, pH 9,2, при 4°C в течение ночи. Планшет дважды промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ; 200 мкл/лунка), блокировали с помощью 1% БСА в ФСБ (200 мкл/лунка) в течение 1 ч при комнатной температуре

и трижды промывали буфером для анализа (TBS, 2 мМ глюкозы, 0,1% БСА, 1 мМ CaCl<sub>2</sub> и 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4), по 200 мкл/лунка. Стабильно трансфицированные клетки  $\alpha\beta 1$  человека извлекали из клеточной суспензии и центрифугировали при 1100 об/мин в течение 5 минут. Осадок ресуспендировали в буфере RPMI 1640 с 1% БСА и инкубировали с 2 мкМ флуоресцентного красителя (BCECF, Molecular Probes, Юджин, штат Орегон, США) в инкубаторе при 37°C в течение 30 минут. Меченые клетки дважды промывали путем центрифугирования при 1100 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в буфере для анализа до  $0,8 \times 10^6$  клеток/мл. В отдельные лунки промытого планшета добавляли по 50 мкл очищенного антитела и по 50 мкл клеток  $\alpha\beta 1$  человека, меченных BCECF, и планшет инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 1 часа. Планшет промывали 3-4 раза буфером для анализа (по 200 мкл/лунка), и регистрировали флуоресценцию, обусловленную прилипшими клетками на планшете, при длине волны 485 нм (возбуждение) и 538 нм (излучение). Процент связывания определяли путем сравнения флуоресценции до последней стадии промывки (т. е. общее число добавленных клеток) с флуоресценцией после промывки (т. е. прилипшие клетки).

Примеры ингибирования  $\alpha\beta 1$  адгезии LAP показаны на **фиг. 7А-Е**. Это включает в себя примеры для коммерческого антитела пан- $\alpha\beta$  (L230), коммерческого антитела пан- $\beta 1$  (mAb13), опубликованного  $\beta 6$ -специфического антитела и низкомолекулярного соединения с8, ранее опубликованного как  $\alpha\beta 1$ -специфичное (Reed NI et al, *Sci Transl Med*, 7 (288): 288ra79 (2015)). Ингибирование клеточной адгезии (т. е. IC50) для всех антител обобщенно представлено в таблице 2.

ТАБЛИЦА 2

Антитело	IC50 $\alpha\beta 1$ (нМ)
Пр. Ат 5	1,0
Пр. Ат 4	2,8
Пр. Ат 19	1,4
Пр. Ат 17	< 1,0
Пр. Ат 18	Блокирования нет
Пр. Ат 5 (трипликаты)	0,4, 0,3, 0,5
Пр. Ат 11	2,5
Пр. Ат 6	9,0
Пр. Ат 12	1,5
Пр. Ат 13	1,3
Пр. Ат 20	1,0
Пр. Ат 7	4,3
Пр. Ат 14	2,2
Пр. Ат 8	9,0
Пр. Ат 9	5,4
Пр. Ат 10	5,0
L230 (пан- $\alpha\beta$ )	1,0

Примеры антител, которые ингибируют адгезию LAP, включают в себя иллюстративное антитело 5, иллюстративное антитело 17, иллюстративное антитело 11, иллюстративное антитело 14 и иллюстративное антитело 8. Примеры антител, которые не ингибируют адгезию LAP, включают в себя иллюстративное антитело 18.

5

#### **Пример 5: $\alpha 4\beta 1$ -ингибирование адгезии белка адгезии клеток сосудистого эндотелия (VCAM)**

Специфичность к  $\alpha 4\beta 1$ -интегрину по сравнению с другими RGD-связывающими интегринными устанавливали путем Octet-скрининга на рекомбинантном белке и/или связывания клеточной поверхности со стабильно трансфицированными клеточными линиями. Антитела также исследовали на предмет связывания с  $\alpha 4\beta 1$  –

10  $\beta 1$ -содержащим интегрином, который не связывает RGD-связывающие лиганды. Чтобы подтвердить отсутствие связывания с  $\alpha 4\beta 1$  в примере 3, антитела также исследовали в анализе клеточной адгезии, чтобы определить, ингибируют ли они взаимодействие  $\alpha 4\beta 1$ //лиганд (т. е. взаимодействие с VCAM).  
Дополнительная перекрестная реактивность с  $\beta 1$ -содержащими интегринными является нежелательной.

96-луночный микротитровальный планшет (Costar 3369) покрывали VCAM-Ig объемом 100 мкл/лунка в концентрации 10 мкг/мл, разведенным в 50 мМ бикарбонате натрия, pH 9,2, при 4°C в течение ночи. Планшет дважды промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ; 200 мкл/лунка), блокировали с помощью 1% БСА в ФСБ (200 мкл/лунка) в течение 1 ч при комнатной температуре и трижды промывали буфером для анализа (TBS, 2 мМ глюкозы, 0,1% БСА, 1 мМ CaCl<sub>2</sub> и 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4), по 200 мкл/лунка. Клетки Jurkat извлекали из клеточной суспензии и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут. Осадок ресуспендировали в

15 буфере RPMI 1640 с 1% БСА и инкубировали с 2 мкМ флуоресцентного красителя (BCECF, Molecular Probes, Юджин, штат Орегон, США) в инкубаторе при 37°C в течение 30 минут. Меченые клетки дважды промывали путем центрифугирования при 1100 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в буфере для анализа до

20  $0,8 \times 10^6$  клеток/мл. В отдельные лунки промытого планшета добавляли по 50 мкл очищенного антитела и по 50 мкл клеток Jurkat, меченных BCECF, и планшет инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 1 часа. Планшет промывали 3-4 раза буфером для анализа (по 200 мкл/лунка), и регистрировали флуоресценцию, обусловленную прилипшими клетками на планшете, при длине волны 485 нм (возбуждение) и 538 нм (излучение). Процент связывания определяли путем сравнения флуоресценции до последней стадии промывки (т. е. общее число добавленных клеток) с флуоресценцией после промывки (т. е. прилипшие клетки).

30 Примеры  $\alpha 4\beta 1$ -ингибирования адгезии VCAM показаны на **фиг. 8**. Это включает в себя примеры для коммерческого антитела пан- $\alpha 4$  (L230), коммерческого антитела пан- $\beta 1$  (mAb13), опубликованного  $\alpha 4$ -специфического антитела (натализумаб) и низкомолекулярного соединения с8, ранее опубликованного как  $\alpha 4\beta 1$ -специфичное (Reed NI et al, *Sci Transl Med*, 7 (288): 288ra79 (2015)). Эти данные подтверждают, что указанные антитела не связываются с  $\alpha 4\beta 1$  и не нарушают адгезию клеток. Примеры включают в себя

35 иллюстративное антитело 17, иллюстративное антитело 19, иллюстративное антитело 4 и иллюстративное антитело 5. Антитела mAb13 (пан- $\beta 1$ ) и натализумаб ( $\alpha 4$ ) ингибируют адгезию, как и ожидалось. Низкомолекулярное соединение с8 действительно ингибирует адгезию  $\alpha 4\beta 1$ /VCAM, хотя связывание  $\alpha 4\beta 1$  не было указано в оригинальной публикации. Последующие опубликованные исследования выявили потенциальную неизвестную и нежелательную перекрестную реактивность интегрин с низкомолекулярным

40 соединением с8 (Wilkinson AL et al, *Eur J Pharmacol*, 842: 239-247 (2019)). Результаты анализа  $\alpha 4\beta 1$ -

ингибирования адгезии VCAM подтверждают, что с8 связывает  $\alpha 4\beta 1$  с достаточной аффинностью, чтобы нарушить связывание с VCAM.

#### Пример 6: анализ связывания на фибробластах

5 Связывание с  $\alpha v\beta 1$  на линиях эндогенных (т. е. не сконструированных) клеток также является желательным. Чтобы непосредственно воздействовать на фибробласты, связывание антител было исследовано на клетках MRC9 – линии фибробластов легких человека, и BLO-11 – линии фибробластов скелетных мышц мыши. Клетки MRC9 были приобретены у Sigma (№ 85020202) и содержались в EMEM (ATCC, № 30-2003) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС от Gibco, № 16000-077). Клетки BLO-11 были

10 приобретены у ATCC (№ CCL-198) и содержались в DMEM (ATCC, № 30-2002) с добавлением 10% ЭТС. Клетки собирали путем инкубации с буфером для диссоциации клеток (Gibco, №13150-016) при 37°C в течение 10 мин, а затем промывали буфером FACS, содержащим  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{MgCl}_2$  (буфер FACS<sup>++</sup>; ФСБ +1% БСА + 1 мМ  $\text{CaCl}_2$  + 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ ). Все этапы окрашивания и промывки выполнялись при 4°C в буфере FACS<sup>++</sup>. В 96-луночный планшет с U-образными лунками высевали по  $0,75 \times 10^6$  клеток на лунку, а затем

15 центрифугировали для удаления супернатанта. Затем клетки ресуспендировали в серийно разведенном первичном антителе и инкубировали в течение 30 минут. После инкубации клетки дважды промывали, а затем инкубировали со вторичным антителом – Alexa Fluor 647  $\alpha$ -IgG человека (Invitrogen, № A21445) в течение еще 30 минут. Затем клетки дважды промывали и фиксировали 1% ПФА, разведенным в ФСБ, в течение 30 мин с последующей финальной промывкой. Сортировку клеток с активацией флуоресценции (FACS)

20 проводили с использованием проточного цитометра BD LSR-II с пятью лазерами (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния, США), а данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo v9 (Treestar, Эшленд, штат Орегон, США) и переносили в аналитическое и графическое программное обеспечение, включая GraphPad Prism 7 (Ла-Хойя, штат Калифорния, США).

Примеры наблюдаемого связывания с MRC9 (клетками фибробластов человека) и BLO-11 (клетками

25 фибробластов мыши) показаны на **фиг. 9A-D**. Примеры антител, которые связывают клеточные линии фибробластов человека и мыши, включают в себя иллюстративное антитело 17, иллюстративное антитело 5, иллюстративное антитело 19 и иллюстративное антитело 4.

#### Пример 7: анализ на LPA-индуцированный PAI-1

30 Чтобы определить, будет ли блокирование  $\alpha v\beta 1$  антителами ингибировать передачу сигналов от TGF $\beta$ , проводили клеточный анализ с использованием уровней экспрессии гена ингибитора активатора плазминогена 1 (PAI-1) в качестве индикатора передачи сигналов вниз по каскаду от рецептора TGF $\beta$ . Клетки MRC9 были приобретены у ATCC (№ CCL-212) и содержались в EMEM (ATCC, № 30-2003), дополненном 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС, № 10082,

35 приобретена у Gibco). Клетки высевали в покрытые ламином 96-луночные планшеты (Corning, № 354410) по 40000 клеток на лунку в полной среде (EMEM с добавлением 10% ЭТС) и инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день клетки промывали в EMEM и подвергали сывороточному голоданию в среде EMEM в течение 3 часов при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки дважды промывали в EMEM и инкубировали в EMEM с добавлением 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА, приобретен у Millipore, № 126626) в присутствии или отсутствии ингибиторов. После 30-минутной инкубации клетки стимулировали

40 с помощью 5 мкм лизофосфатидной кислоты (LPA, приобретена у Sigma-Aldrich, № L7260), предварительно

растворенной в EMEM + 0,1% БСА. После инкубации в течение 20-24 часов при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> среду для культивирования клеток удаляли, а планшеты хранили при -80°C до анализа методом количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР). Уровни экспрессии генов PAI-1 (также известного как SERPINE1) и GAPDH измеряли с помощью наборов реактивов Taqman Cells-to-CT (Ambion, № AM1729), Taqman Gene Expression Master (Ambion № 4369016) с зондами TaqMan человека (SERPINE 1 № 4351368 и GAPDH № 4448491 от Applied Biosystems) и кПЦР, проведенной в системе Vii7 от Applied Biosystems, с последующим анализом с помощью программного обеспечения Quantstudio Real-Time PCR.

Примеры ингибирования PAI-1 показаны на **фиг. 10А-С**. Это включает в себя примеры для коммерческого антитела пан- $\alpha$ v (17E6), коммерческого антитела пан- $\beta$ 1 (mAb13) и антител отрицательного контроля. Иллюстративное антитело 17, иллюстративное антитело 5 и иллюстративное антитело 19 демонстрируют ингибирование передачи сигналов от TGF $\beta$ .

### Пример 8: способы отбора антител

Рекомбинантный секретируемый  $\alpha$ v $\beta$ 1 человека очищали от супернатанта трансфицированных клеток CHO путем совместной экспрессии отдельных альфа- и бета-субъединиц способами, известными в данной области техники (Weinreb P H, *J Biol Chem*. 2004 Apr 23; 279 (17): 17875-87; Chen L L, *Cell Commun Adhes*. 2008 Nov; 15 (4): 317-31; Zhu J, *Mol Cell*, 2008 Dec 26; 32 (6), 849-61). Для отборов использовали три рекомбинантные версии интегрин  $\alpha$ v $\beta$ 1: (1) полноразмерные внеклеточные области  $\alpha$ v $\beta$ 1 без дополнительных меток, (2) полноразмерные внеклеточные области  $\alpha$ v $\beta$ 1, где  $\beta$ 1 слит со структурой «шарнир + Fc-фрагмент IgG1 человека + Avitag» ( $\alpha$ v $\beta$ 1-Fc), и (3) полноразмерные внеклеточные области  $\alpha$ v $\beta$ 1, где  $\alpha$ v-субъединиц слита со структурой «TEV-кислотная суперспираль-метка StrepII», и  $\beta$ 1-субъединиц слита со структурой TEV-основная суперспираль-6xHIS-G4S-Avitag ( $\alpha$ v $\beta$ 1-cc-AVI) (см. Работы Weinreb et al. *J. Biol. Chem*. 279 (17): 17875-17887, 2004; Chen et al. *Cell Communication and Adhesions*, 15: 317-331, 2008; и Zhu et al. *Molecular Cell* 32: 849-861, 2008). В дополнение к этому, рекомбинантные секретируемые  $\alpha$ v $\beta$ 3,  $\alpha$ v $\beta$ 5,  $\alpha$ v $\beta$ 6,  $\alpha$ v $\beta$ 8,  $\alpha$ 4 $\beta$ 1,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 и  $\alpha$ 8 $\beta$ 1 человека были получены в виде рекомбинантной версии № 3 (с суперспиральными метками) аналогичными способами. Все рекомбинантные белки интегринов были биотинилированы для отборов.

Отборы проводили с помощью библиотек экспрессии дрожжей Adimab с использованием очищенного и биотинилированного рекомбинантного  $\alpha$ v $\beta$ 1 версий 1, 2 и 3. Отборы проводили в буфере без катионов, а также в буфере, содержащем CaMg, или буфере, содержащем Mn. Первые две стадии отбора выполняли с помощью клеточной сортировки с магнитной активацией (MACS), а все последующие стадии выполняли с помощью сортировки с активацией флуоресценции (FACS). Использование платформы на основе FACS позволяет визуализировать отобранные библиотеки антител, отображаемых дрожжами или другими клетками (прокариотическими или эукариотическими). С помощью такой визуализации можно разработать отборы для определения представляющего интерес эпитопа с использованием направляющих белков (например, mAb, Fab, лиганды или белки истощения) (см., например, Cherf and Cochran, *Methods Mol Biol*. 1319: 155-75, 2015; Xu et al. *Protein Eng Des Sel*. 26 (10): 663-70, 2013; и Mann et al. *ACS Chem Biol*. 8 (3): 608-16, 2013). Если после 3-го цикла наблюдалось значительное обогащение, последующие циклы были направлены на представляющий интерес эпитопа с использованием L230 (коммерческое антитело пан- $\alpha$ v) и/или истощения на основании  $\alpha$ v-содержащих интегринов ( $\alpha$ v $\beta$ 3 или  $\alpha$ v $\beta$ 5) и  $\beta$ 1-содержащих интегринов ( $\alpha$ 5 $\beta$ 1 или  $\alpha$ 4 $\beta$ 1). Используя эти условия, мы смогли сфокусировать выход антител на тех антителах, которые связывают

несколько RGD-связывающих интегринов, а также на антителах, специфичных в отношении  $\alpha\nu\beta 1$ . В зависимости от степени истощения, отборы приводили к идентификации  $\alpha\nu\beta 1$ -специфических антител (например, иллюстративные антитела 1, 2, 3) или антител, которые связывают несколько RGD-связывающих интегринов (например, иллюстративные антитела 15, 16). Также проводили последующую оптимизацию антител для повышения аффинности определенных антител в отношении  $\alpha\nu\beta 1$ , а также для точной настройки интегринспецифичности. Библиотеки антител создавали с использованием способов оптимизации аффинности, известных в данной области техники (т. е. перетасовки легких цепей и направленного мутагенеза H-CDR1/H-CDR-2). После созревания аффинности антитела были специфичны в отношении  $\alpha\nu\beta 1$ -интегринов (например, иллюстративные антитела 4 и 5) или связывали несколько RGD-связывающих интегринов (например, иллюстративные антитела 17, 18, 19).

После выделения  $\alpha\nu\beta 1$ -специфических антител эти антитела могут использоваться для выполнения будущих направленных отборов. Новые отборы проводили с помощью библиотек экспрессии дрожжей Adimab с использованием очищенного и биотинилированного рекомбинантного  $\alpha\nu\beta 1$  версии и 3. Отборы проводили в буфере содержащем CaMg. Первые две стадии отбора выполняли с MACS, а все последующие стадии выполняли с помощью FACS. После 3-го цикла наблюдали стойкое обогащение и использовали иллюстративное антитело 5 в 4-м цикле для направления на эпитоп более очищенный, чем было достигнуто в предыдущих отборах с использованием L230. Последующие циклы истощения выполняли на  $\alpha\nu$ -содержащих интегрингах ( $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$  или  $\alpha\nu\beta 6$ ) и/или  $\beta 1$ -содержащих интегрингах ( $\alpha 5\beta 1$  или  $\alpha 8\beta 1$ ), с последующим циклом положительного  $\alpha\nu\beta 1$ -отбора в некоторых случаях. Полученные в результате данных отборов антитела прошли также стадию созревания аффинности для повышения аффинности и специфичности в отношении  $\alpha\nu\beta 1$  или  $\alpha\nu\beta 1/\alpha\nu\beta 6$ , с созданием библиотек с использованием способов оптимизации аффинности, известных в данной области техники (т. е. перетасовки легких цепей и направленного мутагенеза H-CDR1/H-CDR-2). После обогащения в отношении  $\alpha\nu\beta 1$  циклы истощения выполняли с  $\alpha\nu\beta 8$  и  $\alpha 5\beta 1$  или  $\alpha 8\beta 1$ , с последующим циклом положительного  $\alpha\nu\beta 1$ -отбора в некоторых случаях. В зависимости от строгости условий истощения, отборы по оптимизации аффинности приводили к идентификации  $\alpha\nu\beta 1$ -специфических антител (например, иллюстративных антител 6, 7, 8, 9, 10),  $\alpha\nu\beta 1/\alpha\nu\beta 6$ -специфических антител (например, иллюстративных антител 11, 12, 13, 14) или антител, которые связывают несколько RGD-связывающих интегринов (например, иллюстративного антитела 20).

Последовательности, ссылки на которые указаны в данном примере:

Аминокислотная последовательность версии №1 белка  $\alpha\nu$  интегрин человека в рекомбинантном  $\alpha\nu\beta 1$ -интегрине представлена ниже.

FNLVDVSPA EYSGPEGSYFGFAVDFVPSASSRMFLLVGAPKANTTQPGIVEGGQVLKCDWSSTRRCQPIEF  
 DATGNRDYAKDDPLEFKSHQWFGASVRSKQDKILACAPLYHWRTEMKQEREPVGTCTFLQDGTKTVEYAP  
 CRSQDIDADGQGFCQGGFSIDFTKADRVLGGPGSFYWQQLISDQVAEIVSKYDPNVYSIKYNNQLATRT  
 AQAIFDDSYLGYSAVVGDFNGDGIDDFVSGVPR AARTLGMVYIYDGNMSSLYNFTGEQMAAYFGFSVA  
 ATDINGDDYADVFIGAPLFMDRGS DGKLQEVGQVS VSLQRASGDFQTTKLN GFEVFARFGSAIAPLGDLDQ  
 DGFNDIAIAAPYGGEDKKGIVYIFNGRSTGLNAVPSQILEGQWAARSMPPSFGYSMKGATDIDKNGYPDLI  
 VGAFGVDRAILYRARPVITVNAGLEVYPSILNQDNKTCSLPGTALKVSCFN VRFCLKADGKGVLPKLNQ  
 VELLDDKLGKQGAIRRALFLYSRSPSHSKNMTISRGGMLMQCEELIAYLRDESEFRDKLTPITIFMEYRLDYRT

AADTTGLQPILNQFTPANISRQAHILLDCGEDNVCKPKLEVSVDSDQKKIYIGDDNPLTLIVKAQNGGEGAY  
 EAELIVSIPLQADFIGVVRNNEALARLSCAFKTENQTRQVVCNPMKAGTQLLAGLRFVHQSEMDS  
 VKFDLQIQSSNLFDKVSPVVSHKVDLAVLAAVEIRGVSSPDHVFLPIPNWEHKENPETEEDVGPVVQHIYEL  
 RNNGPSFSKAMLHLQWPYKYNNTLLYLHYDIDGPMNCTSDMEINPLRIKISSLQTTEKNDTVAGQGER  
 5 DHLITKRDALSEGDIHTLGCQVAQCLKIVCQVGRDRGKSAILYVKSLLWTETFMNKENQNHSLKSSA  
 SFNVIEFPYKLNPIEDITNSTLVTNTWGIQAPMPVP(**SEQ ID NO: 117**)

Аминокислотная последовательность версии №1 белка  $\beta 1$  интегрина человека в рекомбинантном  $\alpha\beta 1$ -интегрине представлена ниже.

10 QTDENRCLKANAKSCGECIQAGPNCGWCTNSTFLQEGMPTSARCCDLEALKKKGCPPDDIENPRGSKDIK  
 KNKNVTNRSGTAEKLPEDITQIQPQQLVLRRLSGEPQFTLKFRAEDYPIDLYYLMDSLYSMKDDLEN  
 VKSLGTDLMNEMRRITSDFRIGFGSFVEKTVMPYISTTPAKLRNPCTSEQNCTSPFSYKNVLSLTNKGEVFN  
 ELVGKQRISGNLDSPEGGFDAIMQVAVCGSLIGWRNVTRLLVFSTDAGFHFAAGDGKLGIVLPNDGQCHLE  
 NNMYTMSHYDYPSIAHLVQKLSENNIQTIFAVTEEFQPVYKELKNLIPKSAVGTLSANSSNVIQLIIDAYNS  
 15 LSSEVILENGKLGSEGVTSYKSYCKNGVNGTGNGRCKSNISIGDEVQFEISITSNKCPKKDSDFSIRPLGFT  
 EEVEVILQYICECECQSEGIPESPKCHEGNGTFECGACRCNEGRVGRHCECSTDEVNSEMDAYCRKENSSE  
 ICSNNGECVCGQVCRKRDNTNEIYSGKFCECDNFNCDRSNGLICGGNGVCKCRVCECNPNYTGSACDCS  
 LDTSTCEASNGQICNGRGICEGVCKCTDPKFQQTCEMCQTCGLGVCAEHKECVQCRAFNKGEKKDTCTQ  
 ECSYFNITKVESRDKLPQPVQDPVSHCKEKDVDDCWFYFTYSVNGNNEVMVHVVENPECPTGPD(**SEQ**  
 20 **ID NO: 118**)

Аминокислотная последовательность версии №2 белка  $\alpha\beta$  интегрина человека в рекомбинантном  $\alpha\beta 1$ -интегрине представлена ниже.

25 FNLDVDSPA EYSGPEGSYFGFAVDFFVPSASSRMFLLVGAPKANTTQPGIVEGGQVLKCDWSSTRRCQPIEF  
 DATGNRDYAKDDPLEFKSHQWFGASVRSKQDKILACAPLYHWRTEMKQEREPVGTCLFQDGTKTVEYAP  
 CRSQDIDADGQGFQGGFSIDFTKADR VLLGGPGSFYWQQLISDQVAEIVSKYDPNVYSIKYNNQLATRT  
 AQAIFDDSYLGYSAVGVDFNGDGIDDFVSGVPRAARTLGMVYIYDGNMSSLYNFTGEQMAAYFGFSVA  
 ATDINGDDYADVFIGAPLFMDRGSQGLQEVGVSVSLQRASGDFQTTKLNQFEVVFARFGSAIAPLGLDLDQ  
 30 DGFNDIAIAAPYGGEDKKGIVYIFNGRSTGLNAVPSQILEGQWAARSMPPSFGYSMKGATDIDKNGYPDLI  
 VGAFGVDRAILYRARPVITVNAGLEVYPSILNQDNKTCSLPGTALKVSCFNVRFLKADGKGVLPKLNQ  
 VELLKDKLQKGAIRRALFLYSRSPSHSKNMTISRGGMLQCEELIAYLRDESEFRDKLTPITIFMEYRLDYRT  
 AADTTGLQPILNQFTPANISRQAHILLDCGEDNVCKPKLEVSVDSDQKKIYIGDDNPLTLIVKAQNGGEGAY  
 EAELIVSIPLQADFIGVVRNNEALARLSCAFKTENQTRQVVCNPMKAGTQLLAGLRFVHQSEMDS  
 35 VKFDLQIQSSNLFDKVSPVVSHKVDLAVLAAVEIRGVSSPDHVFLPIPNWEHKENPETEEDVGPVVQHIYEL  
 RNNGPSFSKAMLHLQWPYKYNNTLLYLHYDIDGPMNCTSDMEINPLRIKISSLQTTEKNDTVAGQGER  
 DHLITKRDALSEGDIHTLGCQVAQCLKIVCQVGRDRGKSAILYVKSLLWTETFMNKENQNHSLKSSA  
 SFNVIEFPYKLNPIEDITNSTLVTNTWGIQAPMPVP(**SEQ ID NO: 117**)

40 Аминокислотная последовательность версии №2 белка  $\beta 1$  интегрина человека в рекомбинантном  $\alpha\beta 1$ -интегрине представлена ниже. Подчеркивание обозначает последовательность, содержащую структуру

«шарнир, Fc-область IgG1 человека и метка Avitag».

QTDENRCLKANAKSCGECIQAGPNCGWCTNSTFLQEGMPTSARCDDLEALKKKGCPPDDIENPRGSKDIK  
 KNKNVTNRSKGTAEKLPEDITQIQPQQLVLRRLSGEPQTFTLKFKAEDYPIDLYYLMDSL SYSMKDDLEN  
 VKSLGTDLMNEMRRITSDFRIGFGSFVEKTVMPYISTTPAKLRNPCTSEQNCTSPFSYKNVLSLTKGEVFN  
 5 ELVGKQRISGNLDSPEGGFDAIMQVAVCGSLIGWRNVTRLLVFSTDAGFHFAAGDGKLGIVLPNDGQCHLE  
 NNMYTMSHYDYPSIAHLVQKLENNIQTIFAVTEEFQPVYKELKNLIPKSAVGTLSANSSNVIQLIIDAYNS  
 LSSEVILENGKLSEGVTISYKSYCKNGVNGTGENGRKCSNISIGDEVQFEISITSNKCPKKDSDFSIRPLGFT  
 EEVEVILQYICECECQSEGIPESPKCHEGNGTFECGACRCNEGRVGRHCECSTDEVNSEDMDAYCRKENSSE  
 ICSNNGECVCGQCVCRKRDNTNEIYSGKFCECDNFNCDRSNGLICGGNGVCKCRVCECNPNYTGSAACDCS  
 10 LDTSTCEASNGQICNGRGICEGVCKCTDPKFQGTCEMCQTCLGVCAEHKECVQCRAFNGEKKDTCTQ  
 ECSYFNITKVESRDKLPQVPQDPVSHCKEKDVDDCWYFYFTYSVNGNNEVMVHVVENPECPTGPDDKTHT  
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYITLPPSRDELTKNQVSLTCL  
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNYT  
 15 QKLSLSLSPGGGSGLNDIFEAQKIEWHE(SEQ ID NO: 119)

Аминокислотная последовательность версии №3 белка  $\alpha$ v интегрин человека в рекомбинантном  $\alpha$ v $\beta$ 1-интегрине представлена ниже. Подчеркивание обозначает структуру «TEV-кислотная суперспираль-метка StrepII».

FNLVDVSPA EYSGPEGSYFGFAVDFFVPSASSRMFLLVGAPKANTTQPGIVEGGQVLKCDWSSTRRCQPIEF  
 20 DATGNRDYAKDDPLEFKSHQWFGASVRSKQDKILACAPLYHWRTEMKQEREPVGTCLFQDGTKTVEYAP  
 CRSQDIDADGQFCQGGFSIDFTKADRVLGGPGSFYWQQLISDQVAEIVSKYDPNVYSIKYNNQLATRT  
 AQAIFDDSYLGYSAVGVDFNGDGIDDFVSGVPRAARTLGMVYIYDGNMSSLYNFTGEQMAAYFGFSVA  
 ATDINGDDYADVFIGAPLFMDRGS DGKLQEVGQVS VSLQRASGDFQTTKLN GFV FARFGSAIAPLGDL DQ  
 DGFNDIAIAAPYGGEDKKGIVYIFNGRSTGLNAVPSQILEGQWAARSMPPSFGYSMKGATDIDKNGYPDLI  
 25 VGAFGVDRAILYRARPVITV NAGLEVYPSILNQDNKTCSLPGTALKVSCFNVRFLKADGKGVLPRLNLFQ  
 VELLDDK LKQKGAIRRALFLYSRSPSHSKNMTISRGGMLMQCEELIAYLRDESEFRDKLTPITIFMEYRLDYRT  
 AADTTGLQPILNQFTPANISRQAHILLDCGEDNVCKPKLEVSVDSDQKKIYIGDDNPLTLIVKAQNQGE GAY  
 EAELIVSIPLQADFIGVVRNNEALARLSCAFKTENQTRQVVC DLGNPMKAGTQLLAGLRF SVHQQSEMDTS  
 VKFDLQIQSSNLFDKVSPV VSHKVDLAVLA AVEIRGVSSPDHVF LPIP NWEHKENPETEEDVGPVVQH IYEL  
 30 RNNGPSSFSKAMLHLQWPYKYNNTLLYILHYDIDGPMNCTSDMEINPLRIKISSLQTTEKNDTVAGQGER  
 DHLITKRDALSEGDIHTL GCGVAQCLKIVCQVGR LDRGKSAILYVKSLLWTETFMNKENQNH SYSLKSSA  
 SFNVIEFPYKNLPIEDITNSTLVTTNVTWGIQPAPMPVPTGGLENLYFQGGENAQCEKELQALEKENA QLEW  
ELQALEKELAQWSHPQFEK(SEQ ID NO: 120)

35 Аминокислотная последовательность версии №3 белка  $\beta$ 1 интегрин человека в рекомбинантном  $\alpha$ v $\beta$ 1-интегрине представлена ниже. Подчеркивание обозначает структуру «TEV-основная суперспираль-метка 6xHIS-Avitag».

QTDENRCLKANAKSCGECIQAGPNCGWCTNSTFLQEGMPTSARCDDLEALKKKGCPPDDIENPRGSKDIK  
 KNKNVTNRSKGTAEKLPEDITQIQPQQLVLRRLSGEPQTFTLKFKAEDYPIDLYYLMDSL SYSMKDDLEN  
 40 VKSLGTDLMNEMRRITSDFRIGFGSFVEKTVMPYISTTPAKLRNPCTSEQNCTSPFSYKNVLSLTKGEVFN  
 ELVGKQRISGNLDSPEGGFDAIMQVAVCGSLIGWRNVTRLLVFSTDAGFHFAAGDGKLGIVLPNDGQCHLE

NNMYTMSHYDYPSIAHLVQKLSENNIQTIFAVTEEFQPVYKELKNLIPKSAVGTLSANSSNVIQLIIDAYNS  
LSSEVILENGKLSEGVITISYKSYCKNGVNGTGENGRKCSNISIGDEVQFEISITSNKCPKKDSDFSFKIRPLGFT  
EEVEVILQYICECECQSEGIPESPKCHEGNGTFECGACRCNEGRVGRHCECSTDEVNSEDMDAYCRKENSSE  
ICSNNGECVCGQCVCRKRDNTNEIYSGKFCECDNFNCDRSNGLICGGNGVCKCRVCECNPNYTGSACDCS  
5 LDTSTCEASNGQICNNGRGICECGVCKCTDPKFQGGTCEMCQTCLGVCAEHKECVQCRAFNGGKEDTCTQ  
ECSYFNITKVESRDKLPQPVQDPVSHCKEKDVDDCWFYFTYSVNGNNEVMVHVVENPECPTGPDTSGL  
NLYFOGGKNAQCKKKLQALKKKNAQLKWKLQALKKKLAQGGHHHHHHGGGGSGGGGSGGGGSGGGG  
SLNDIFEAQKIEWHE(SEQ ID NO: 121)

#### 10 **ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ РЕАЛИЗАЦИИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Хотя данное изобретение было описано в сочетании с его подробным описанием, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема данного изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем следующей формулы изобретения.

15

20

25

30

35

40

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Антитело, которое специфически связывается с интегрином  $\alpha\beta 1$ , но не с другими интегринными, и при этом, необязательно, указанное антитело имеет одно или большее число из следующих свойств: (i) связывается с высокой аффинностью, характеризующейся показателем  $KD \leq 20$  нм (бивалентная аффинность), с  $\alpha\beta 1$  человека; (ii) блокирует взаимодействие  $\alpha\beta 1$  с его лигандом; (iii) является зависимым от катионов для связывания с  $\alpha\beta 1$  человека; (iv) является независимым от катионов для связывания с  $\alpha\beta 1$  человека; (v) связывается с  $\alpha\beta 1$  на фибробластах; и (vi) ингибирует ответ фибробластов на TGF $\beta$ .

2. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с и/или связывает тот же эпитоп, что и референсное антитело против интегринного  $\alpha\beta 1$ , содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VH и VL указанного референсного антитела содержат:

- (i) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, соответственно;
- (ii) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 58, соответственно;
- (iii) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12, соответственно;
- (iv) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, соответственно;
- (v) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28, соответственно;
- (vi) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12, соответственно;
- (vii) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 45, соответственно;
- (viii) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 50, соответственно;
- (ix) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 57, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 58, соответственно; или
- (x) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 58, соответственно.

3. Антитело, которое специфически связывается как с интегрином  $\alpha\beta 1$ , так и с интегрином  $\alpha\beta 6$ , но не с другими интегринными, и при этом, необязательно, указанное антитело имеет одно или большее число из следующих свойств: (i) связывается с высокой аффинностью, характеризующейся показателем  $KD \leq 20$  нм (бивалентная аффинность), с  $\alpha\beta 1$  человека, и с аффинностью в 100 нМ (бивалентная аффинность) с  $\alpha\beta 6$  человека; (ii) блокирует взаимодействие  $\alpha\beta 1$  с его лигандом и/или  $\alpha\beta 6$  с его лигандом; (iii) является зависимым от катионов для связывания с  $\alpha\beta 1$  человека и/или с  $\alpha\beta 6$  человека; (iv) связывается с  $\alpha\beta 1$  на фибробластах; и (v) ингибирует ответ фибробластов на TGF $\beta$ .

4. Антитело по п. 3, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с и/или связывает тот же эпитоп,

что и референсное антитело, которое связывает как интегрин  $\alpha\beta 1$ , так и интегрин  $\alpha\beta 6$ , и содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VH и VL указанного референсного антитела содержат:

- 5 (i) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 68, соответственно;
- (ii) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 70, соответственно;
- (iii) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 72, соответственно; или
- 10 (iv) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 76, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 77.

5. Антитело, которое специфически связывается с интегрином  $\alpha\beta 1$  и еще с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 1\beta 3$ , и при этом, необязательно, указанное антитело имеет одно или большее число из следующих свойств: (i) связывается с высокой аффинностью, характеризующейся показателем  $KD \leq 20$  нм (бивалентная аффинность), с  $\alpha\beta 1$  человека, и с аффинностью в 100 нМ (бивалентная аффинность) с другими RGD-связывающими интегринными; (ii) блокирует взаимодействие  $\alpha\beta 1$  с его лигандом и/или взаимодействие интегринного семейства с его лигандом; (iii) является зависимым от катионов для связывания с  $\alpha\beta 1$  человека и/или с RGD-связывающими интегринными; (iv) является независимым от катионов для связывания с  $\alpha\beta 1$  человека и/или с RGD-связывающими интегринными; (v) связывается с  $\alpha\beta 1$  на фибробластах и/или с RGD-связывающими интегринными на фибробластах; и (vi) ингибирует ответ фибробластов на TGF $\beta$ .

15

20

6. Антитело по п. 5, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с и/или связывает тот же эпитоп, что и референсное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), при этом VH и VL указанного референсного антитела содержат:

25

- (i) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 82, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 83, соответственно;
- (ii) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 92, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 93, соответственно;
- 30 (iii) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 92, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 95, соответственно;
- (iv) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 100, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28, соответственно;
- 35 (v) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 104, соответственно; или
- (vi) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49, и аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 107, соответственно.

7. Антитело, которое связывается с интегрином  $\alpha\beta 1$ , но не с другими интегринными, при этом указанное антитело содержит область VH, содержащую VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, и область VL, содержащую

40

VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, при этом VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 содержат:

- (i) SEQ ID NO: 32, 34, 17, 18, 19 и 20, соответственно;
- (ii) SEQ ID NO: 60, 39, 55, 18, 19 и 56, соответственно;
- 5 (iii) SEQ ID NO: 4, 6, 7, 8, 9 и 10, соответственно;
- (iv) SEQ ID NO: 14, 16, 17, 18, 19 и 20, соответственно;
- (v) SEQ ID NO: 4, 6, 23, 24, 25 и 26, соответственно;
- (vi) SEQ ID NO: 29, 6, 7, 8, 9 и 10, соответственно;
- (vii) SEQ ID NO: 37, 39, 40, 41, 42 и 43, соответственно;
- 10 (viii) SEQ ID NO: 37, 39, 46, 18, 47 и 48, соответственно;
- (ix) SEQ ID NO: 52, 54, 55, 18, 19 и 56, соответственно; или
- (x) SEQ ID NO: 63, 54, 55, 18, 19 и 56, соответственно.

8. Антитело по п. 7, отличающееся тем, что:

- 15 (i) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: 35 и 22, соответственно;
- (ii) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным
- 20 в SEQ ID NO: 61 и 58, соответственно;
- (iii) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: 11 и 12, соответственно;
- (iv) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным
- 25 в SEQ ID NO: 21 и 22, соответственно;
- (v) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: 27 и 28, соответственно;
- 30 (vi) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: 30 и 12, соответственно;
- (vii) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным
- 35 в SEQ ID NO: 44 и 45, соответственно;
- (viii) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: 49 и 50, соответственно;
- (ix) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным
- 40 в SEQ ID NO: 57 и 58, соответственно; или

(x) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: 64 и 58, соответственно.

5 9. Антитело, которое связывается как с интегрином  $\alpha\beta 1$ , так и с интегрином  $\alpha\beta 6$ , но не с другими интегринными, при этом указанное антитело содержит область VH, содержащую VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, и область VL, содержащую VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, при этом VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 содержат:

- 10 (i) SEQ ID NO: 37, 39, 40, 65, 66 и 67, соответственно;  
(ii) SEQ ID NO: 37, 39, 40, 65, 66 и 69, соответственно;  
(iii) SEQ ID NO: 37, 39, 46, 18, 47 и 71, соответственно; или  
(iv) SEQ ID NO: 37, 39, 73, 74, 42 и 75, соответственно.

10. Антитело по п. 9, отличающееся тем, что:

15 (i) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: 44 и 68, соответственно;

20 (ii) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: 44 и 70, соответственно;

(iii) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: 49 и 72, соответственно; или

25 (iv) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: 76 и 77, соответственно.

11. Антитело, которое связывается с интегрином  $\alpha\beta 1$  и еще с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 1\beta 3$ , при этом указанное антитело содержит область VH, содержащую VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, и область VL, содержащую VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, при этом VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 содержат:

- 30 (i) SEQ ID NO: 4, 6, 78, 79, 80 и 81, соответственно;  
(ii) SEQ ID NO: 85, 87, 88, 89, 90 и 91, соответственно;  
(iii) SEQ ID NO: 85, 87, 88, 89, 90 и 94, соответственно;  
35 (iv) SEQ ID NO: 97, 99, 23, 24, 25 и 26, соответственно;  
(v) SEQ ID NO: 14, 16, 17, 101, 102 и 103, соответственно; или  
(vi) SEQ ID NO: 37, 39, 46, 105, 80 и 106, соответственно.

12. Антитело по п. 11, отличающееся тем, что:

40 (i) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным

в SEQ ID NO: 82 и 83, соответственно;

(ii) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: 92 и 93, соответственно;

5 (iii) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: 92 и 95, соответственно;

(iv) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: 100 и 28, соответственно;

(v) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: 21 и 104, соответственно; или

15 (vi) указанные область VH и область VL содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или на 100% идентична аминокислотным последовательностям, указанным в SEQ ID NO: 49 и 107, соответственно.

13. Антитело по любому из пп. 1-12, отличающееся тем, что указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

20

14. Антитело по любому из пп. 1-12, отличающееся тем, что указанное антитело содержит агликозилированную константную область человека.

15. Антитело по любому из пп. 1-12, отличающееся тем, что указанное антитело содержит агликозилированную область Fc IgG1 человека, область Fc SAA IgG2 человека, область Fc IgG4(S228P) человека или агликозилированную область Fc IgG4(S228P)/G1 человека.

25

16. Антитело по любому из пп. 1-15, отличающееся тем, что указанное антитело содержит константную область легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека.

30

17. Антитело по любому из пп. 1-12, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой полноразмерное антитело, однодоменное антитело, гуманизованное антитело, химерное антитело, биспецифическое антитело, Fv, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub>, диатело, наноантитело, Fab и F(ab')<sub>2</sub>.

35

18. Антитело по любому из пп. 1-17, дополнительно содержащее фрагмент, продлевающий период полужизни.

19. Антитело по любому из пп. 1-18, дополнительно содержащее обнаруживаемую метку.

40

20. Антитело по любому из пп. 1-19, дополнительно содержащее терапевтический агент.

21. Антитело по любому из пп. 1-17, дополнительно содержащее радиоизотоп.
22. Антитело по любому из пп. 1-17, дополнительно содержащее химиотерапевтический или радиотерапевтический агент.
- 5 23. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-22.
24. Полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующий(-е) антитело по любому из пп. 1-17.
- 10 25. Вектор или векторы, содержащий(-е) полинуклеотид или полинуклеотиды по п. 24.
26. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или полинуклеотиды по п. 24, или содержащая вектор или векторы по п. 25.
- 15 27. Способ получения антитела против интегрина, включающий в себя:  
(а) культивирование клетки-хозяина по п. 26 в условиях, которые позволяют экспрессировать указанное антитело; и  
(б) выделение указанного антитела.
- 20 28. Способ по п. 27, дополнительно включающий в себя приготовление антитела в виде стерильного состава, пригодного для введения человеку.
- 25 29. Способ лечения или профилактики фиброза у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий в себя введение указанному субъекту-человеку терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 1-20.
- 30 30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что фиброз выбран из группы, состоящей из фиброза печени, фиброза легких, фиброза почек, фиброза сердца, артрофиброза, фиброза средостения, миелофиброза, нефрогенного системного фиброза, болезни Пейрони, прогрессивного массивного фиброза, фиброза малых дыхательных путей, фиброза, связанного с хроническим обструктивным заболеванием легких, и забрюшинного фиброза.
- 35 31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что фиброз представляет собой фиброз печени.
32. Способ по п. 29, отличающийся тем, что фиброз представляет собой идиопатический фиброз легких.
33. Способ по п. 29, отличающийся тем, что фиброз представляет собой склеродермию / системный склероз.
- 40 34. Способ лечения или профилактики хронической болезни почек у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий в себя введение указанному субъекту-человеку терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 1-20.

35. Способ лечения или профилактики онкологического заболевания у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий в себя введение указанному субъекту-человеку терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 1-22.
- 5 36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что онкологическое заболевание имеет эпителиальное происхождение, и при этом, необязательно, указанное онкологическое заболевание эпителиального происхождения представляет собой плоскоклеточную карциному, аденокарциному, переходно-клеточную карциному или базально-клеточную карциному.
- 10 37. Способ по п. 35, отличающийся тем, что онкологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака молочной железы, меланомы, рака предстательной железы, рака яичника, рака шейки матки, опухолей головного мозга и центральной нервной системы, и глиобластомы.
- 15 38. Способ ингибирования агрегации тромбоцитов у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий в себя введение указанному субъекту-человеку терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 1-20.
- 20 39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что указанное ингибирование предназначено для лечения острого коронарного синдрома.
- 25 40. Способ лечения или профилактики офтальмологического заболевания или нарушения у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий в себя введение указанному субъекту-человеку терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 1-20.
- 30 41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что указанное офтальмологическое заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из возрастной макулярной дегенерации (ВМД), влажной ВМД, макулярного отека и диабетической ретинопатии.
- 35 42. Способ лечения или профилактики острого поражения почек, острого поражения легких или острого поражения печени у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий в себя введение указанному субъекту-человеку терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 1-20.
- 40 43. Способ лечения или профилактики неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий в себя введение указанному субъекту-человеку терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 1-20.
44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что НАЖБП представляет собой неалкогольный стеатогепатит (НАСГ).
- 40 45. Способ идентификации антитела, которое специфически связывается с интегрином  $\alpha v \beta 1$ , но не с другими интегринными из популяции антител, включающий в себя отбор антитела с использованием направленного

отбора с помощью направляющего антитела, которое представляет собой любое из антител по пп. 1, 2, 4 или 6-12.

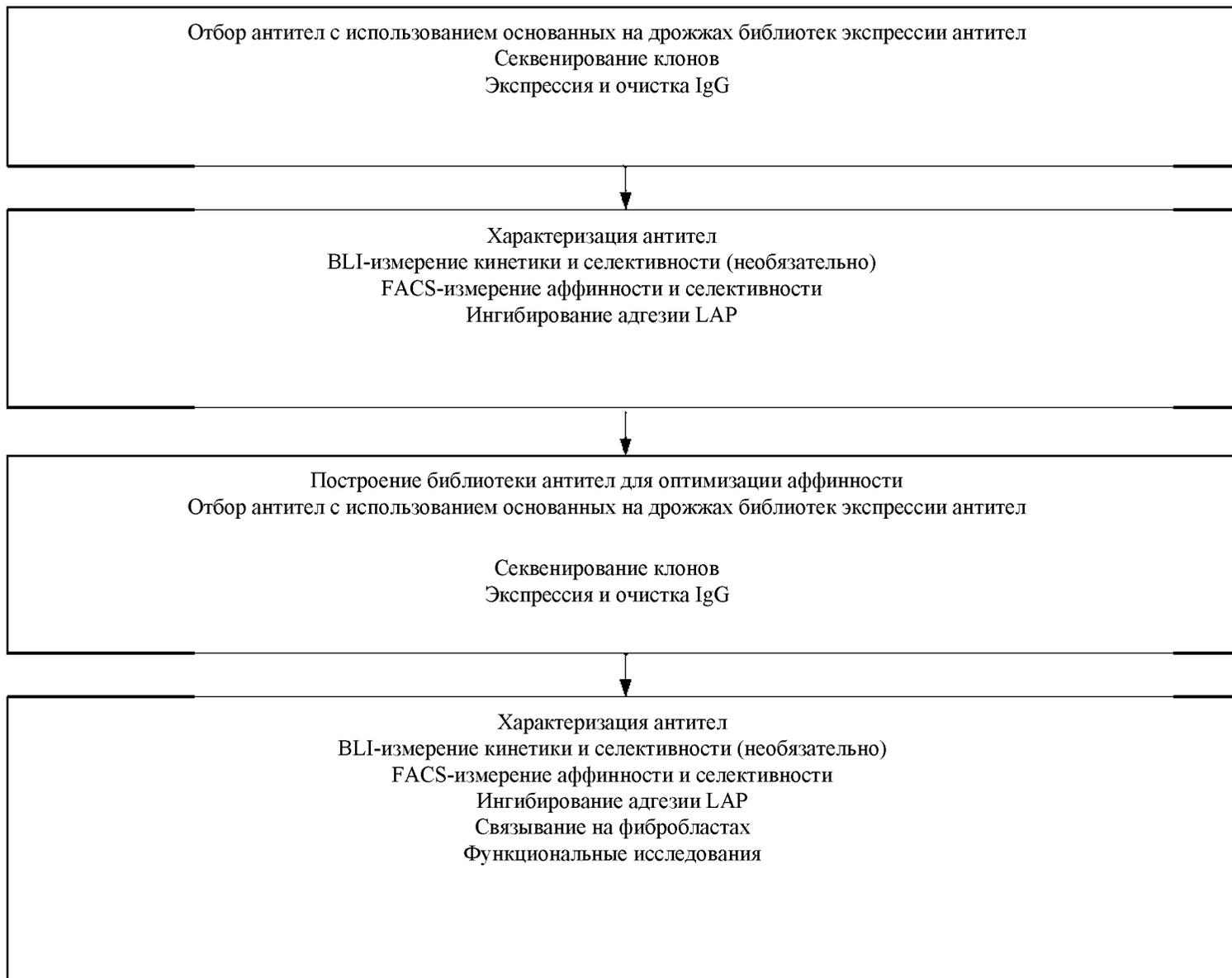
- 5 46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что указанная популяция антител содержит библиотеку антител, экспрессируемую на поверхности прокариотических клеток.
47. Способ по п. 45, отличающийся тем, что указанная популяция антител содержит библиотеку антител, экспрессируемую на поверхности эукариотических клеток.
- 10 48. Способ по п. 45, отличающийся тем, что указанная популяция антител содержит библиотеку антител, экспрессируемую на поверхности клеток дрожжей.
- 15 49. Способ по любому из пп. 45-48, включающий в себя этап отбора антитела, которое связывается с полипептидом или полипептидами, содержащим(-и) внеклеточные домены  $\alpha\nu$  и  $\beta 1$ , при этом, необязательно, указанный этап выполняют при отсутствии катионов, в присутствии кальция и магния или в присутствии марганца, и при этом, также необязательно, указанный отбор выполняют с помощью MACS и/или FACS.
- 20 50. Способ по любому из пп. 45-49, дополнительно включающий в себя истощение антител, которые связываются с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ ,  $\alpha\nu\beta 6$ ,  $\alpha\nu\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 4\beta 1$ .
- 25 51. Способ по любому из пп. 45-50, дополнительно включающий в себя обогащение антителами, которые специфически связываются с интегрином  $\alpha\nu\beta 1$ , путем отбора антител, которые связываются с интегрином  $\alpha\nu\beta 1$ .
52. Способ по любому из пп. 45-51, дополнительно включающий в себя обеспечение созревания аффинности отобранных антител.
- 30 53. Способ идентификации антитела из популяции антител, при котором указанное антитело специфически связывается как с интегрином  $\alpha\nu\beta 1$ , так и с интегрином  $\alpha\nu\beta 6$ , включающий в себя отбор антитела с использованием направленного отбора с помощью направляющего антитела, которое представляет собой любое из антител по пп. 1, 2, 4 или 6-12.
- 35 54. Способ по п. 53, отличающийся тем, что указанная популяция антител содержит библиотеку антител, экспрессируемую на поверхности прокариотических клеток.
55. Способ по п. 53, отличающийся тем, что указанная популяция антител содержит библиотеку антител, экспрессируемую на поверхности эукариотических клеток.
- 40 56. Способ по п. 53, отличающийся тем, что указанная популяция антител содержит библиотеку антител, экспрессируемую на поверхности клеток дрожжей.

57. Способ по любому из пп. 53-56, включающий в себя этап отбора антитела, которое связывается с полипептидом или полипептидами, содержащим(-и) внеклеточные домены  $\alpha\nu$  и  $\beta 1$  и/или внеклеточные домены  $\alpha\nu$  и  $\beta 6$ , при этом, необязательно, указанный этап выполняют при отсутствии катионов, в присутствии кальция и магния или в присутствии марганца, и при этом, также необязательно, указанный отбор выполняют с помощью MACS и/или FACS.

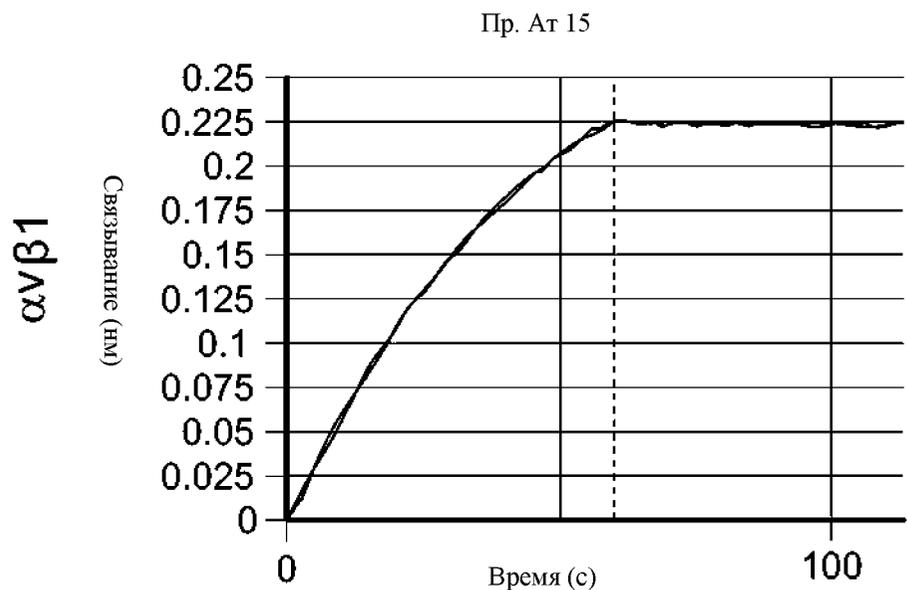
58. Способ по любому из пп. 53-57, дополнительно включающий в себя истощение антител, которые связываются с одним или большим числом интегринов, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ ,  $\alpha\nu\beta 8$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  и  $\alpha 4\beta 1$ .

59. Способ по любому из пп. 53-58, дополнительно включающий в себя обогащение антителами, которые специфически связываются с интегрином  $\alpha\nu\beta 1$  и с интегрином  $\alpha\nu\beta 6$ , путем отбора антител, которые связываются с интегринными  $\alpha\nu\beta 1$  и  $\alpha\nu\beta 6$ .

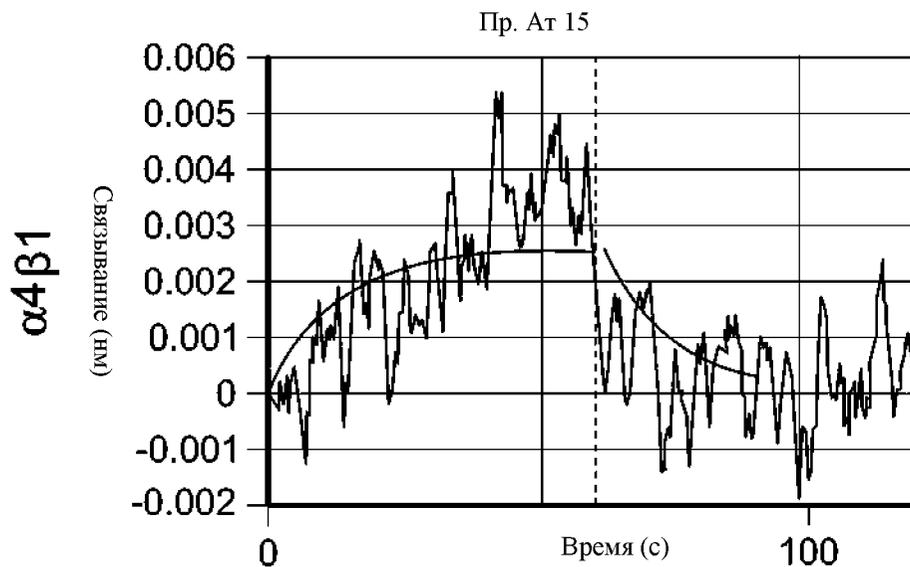
60. Способ по любому из пп. 53-59, дополнительно включающий в себя обеспечение созревания аффинности отобранных антител.



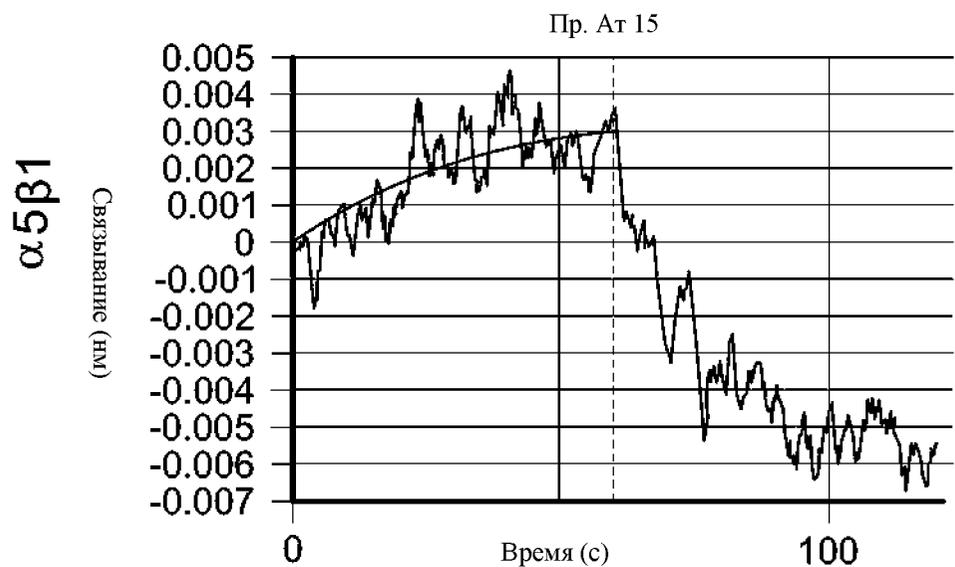
Фиг. 1



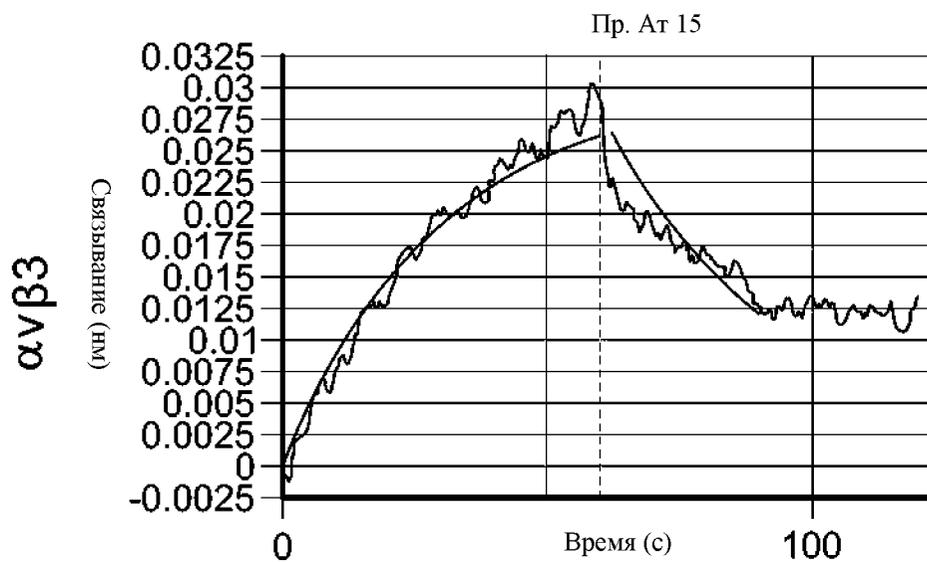
Фиг. 2А



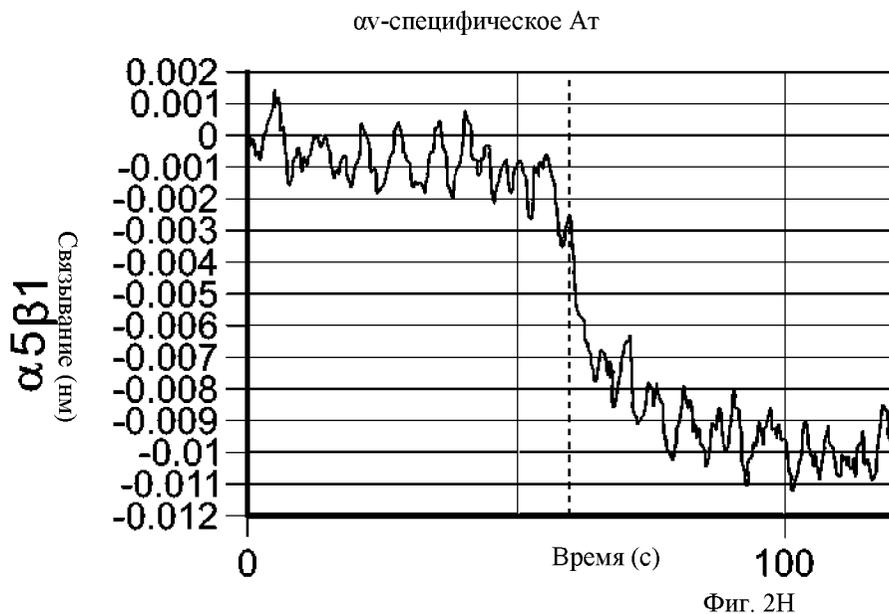
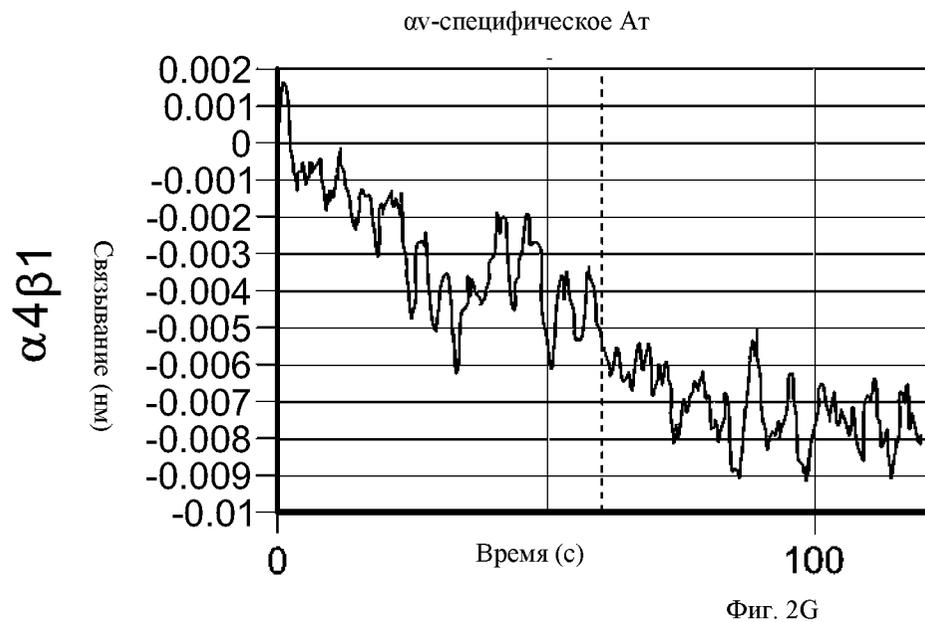
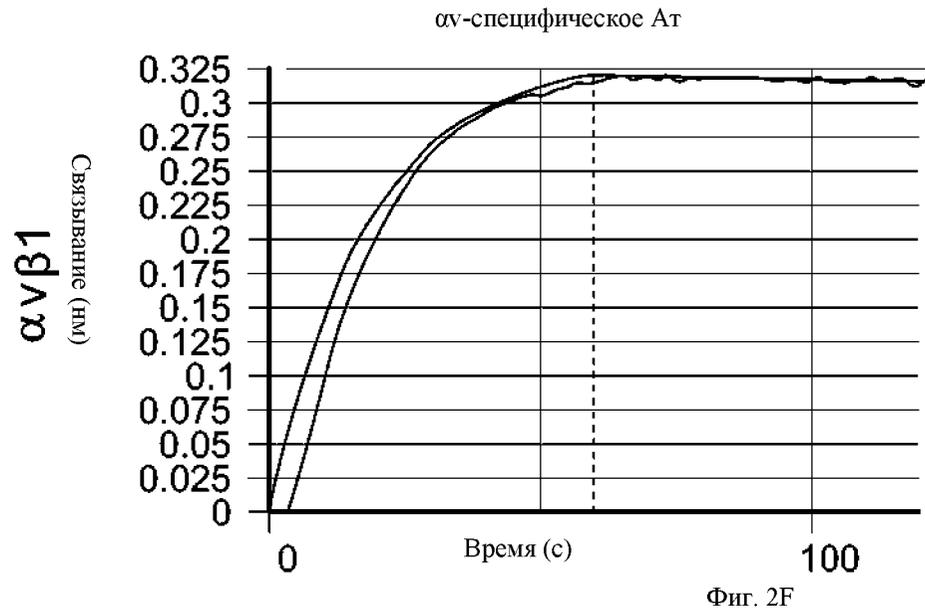
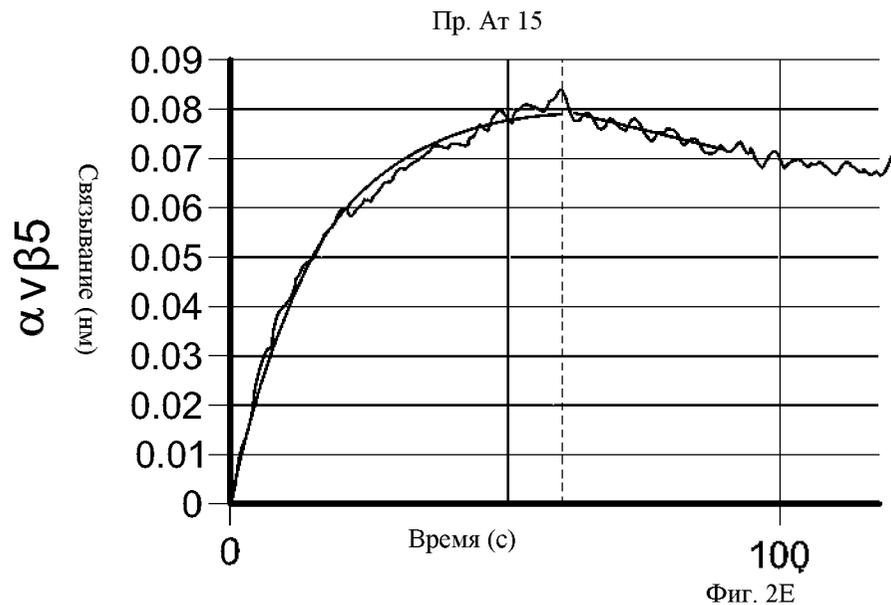
Фиг. 2В

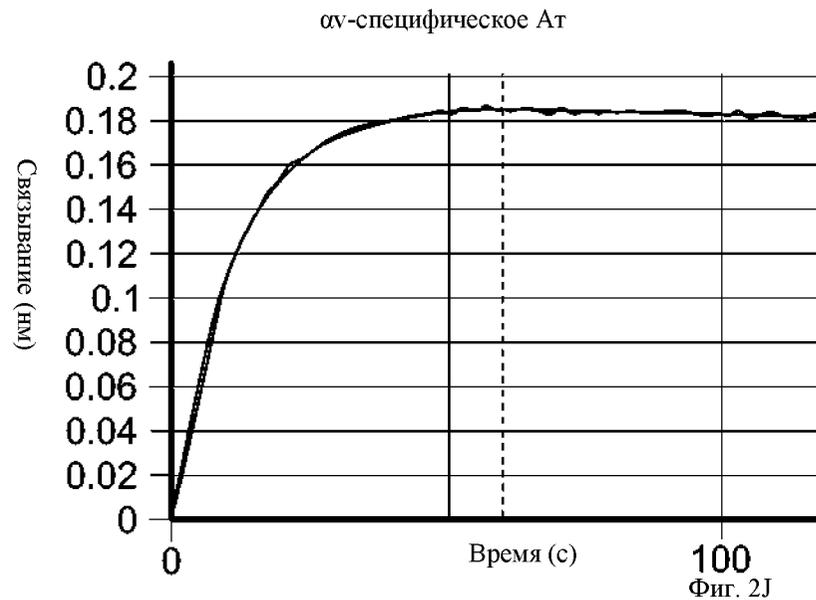
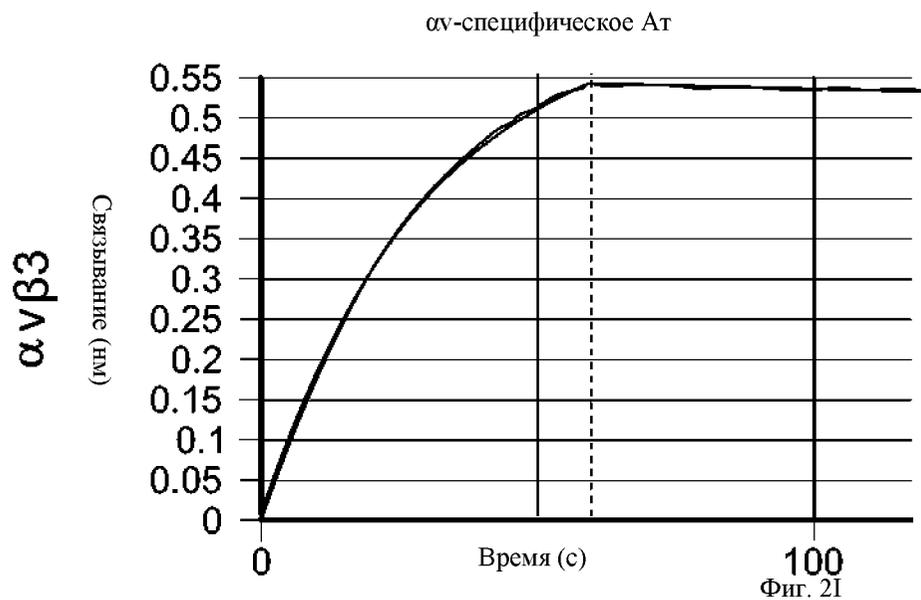


Фиг. 2С



Фиг. 2D

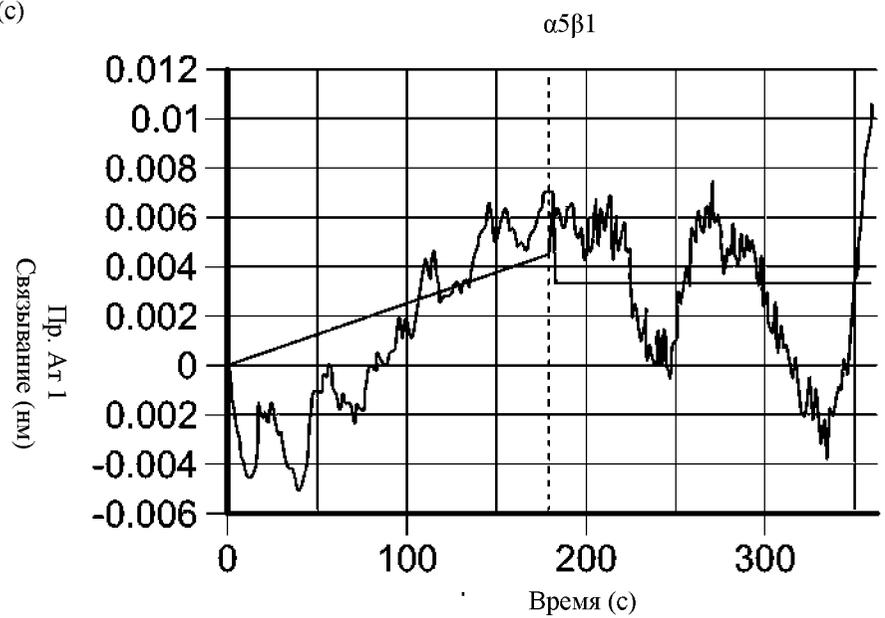
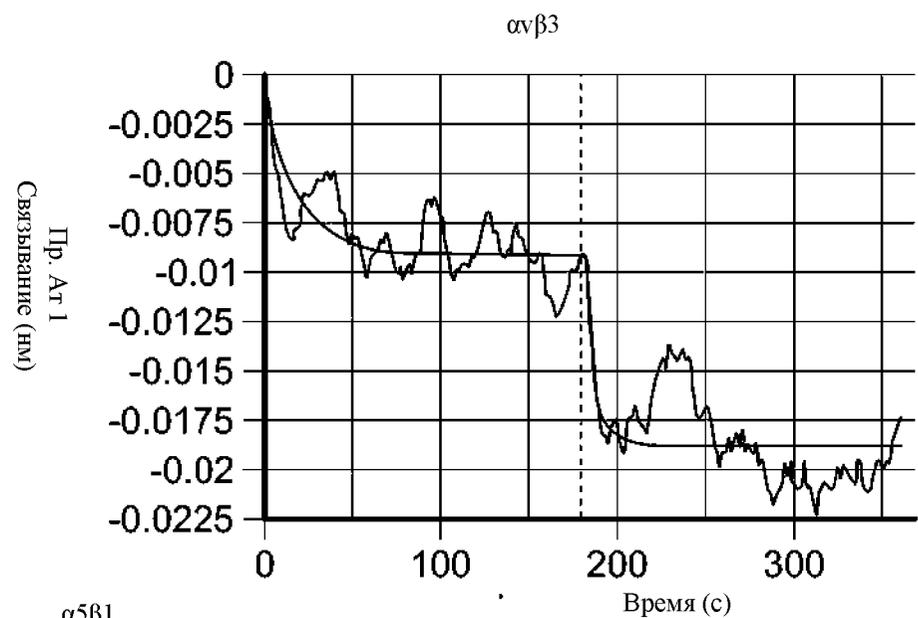
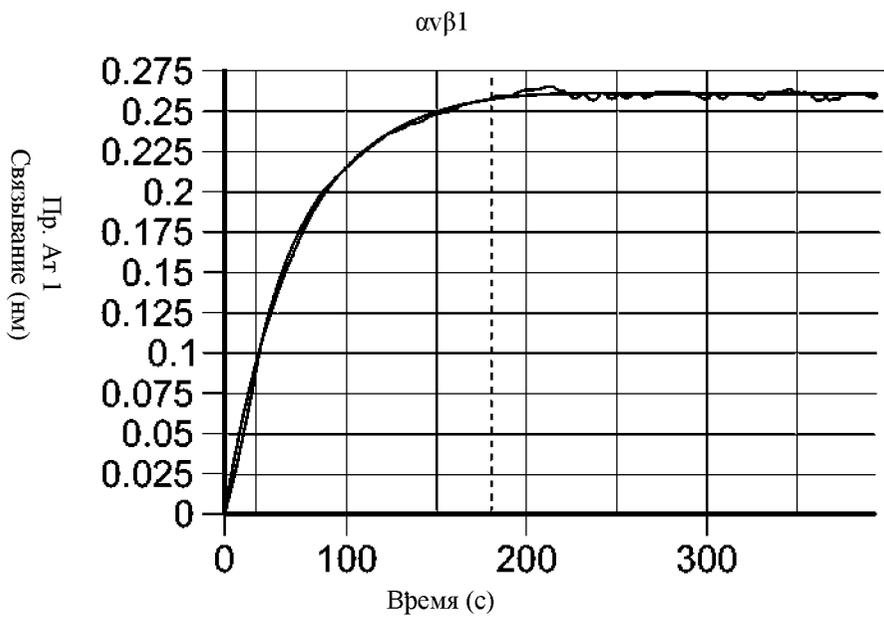




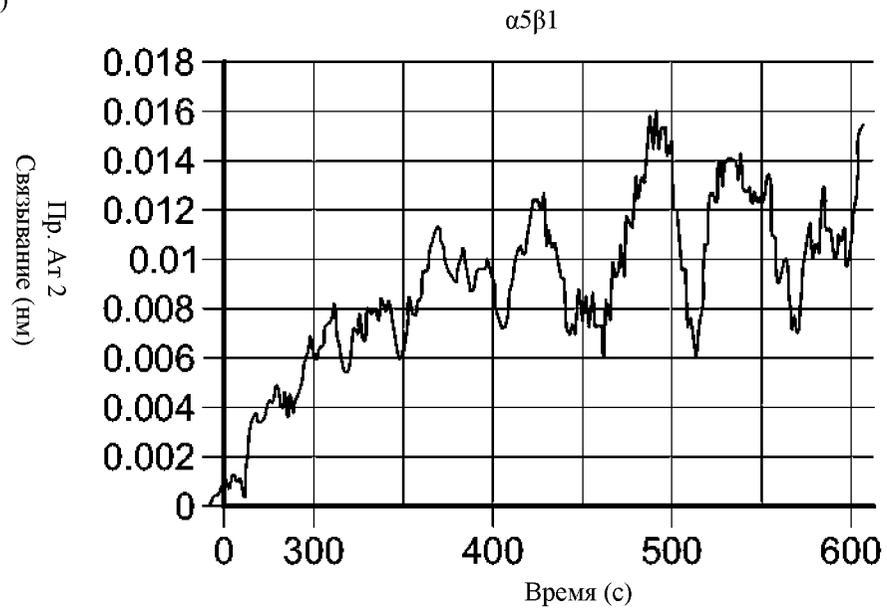
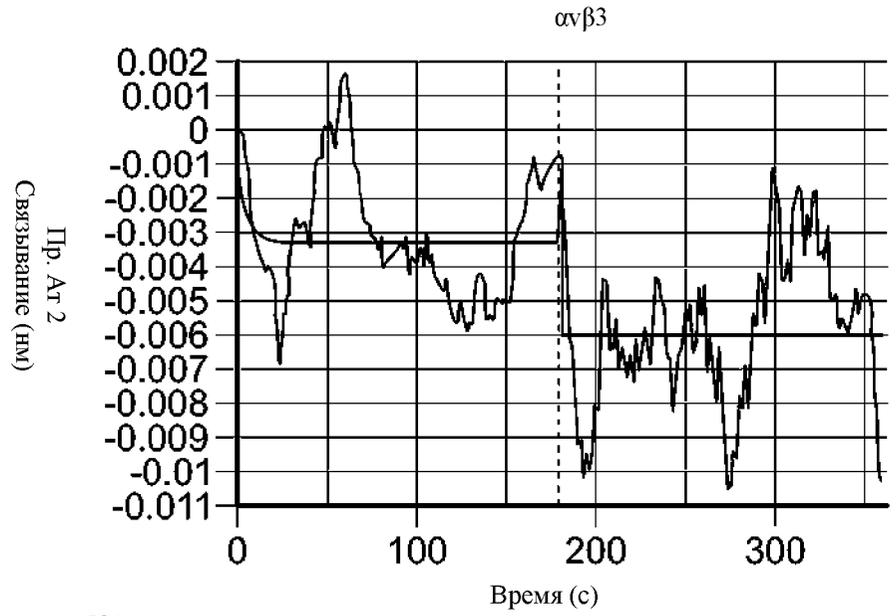
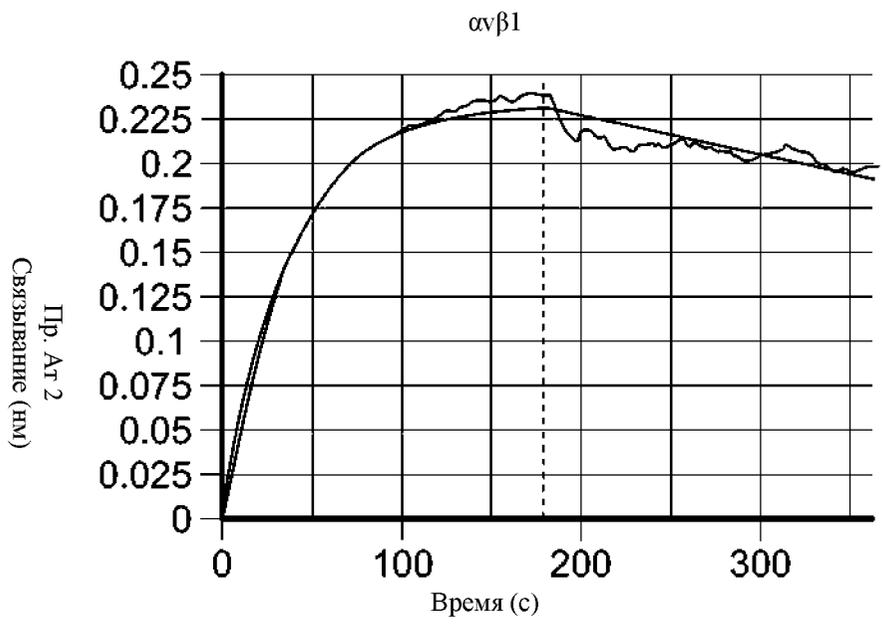
Ответный сигнал Octet

	Иллюстративное Ат 15	$\alpha\nu$ -специфическое Ат
$\alpha\nu\beta 1$	0.21	0.31
$\alpha 4\beta 1$	0	0
$\alpha 5\beta 1$	0	0
$\alpha\nu\beta 3$	0.03	0.52
$\alpha\nu\beta 5$	0.08	0.18

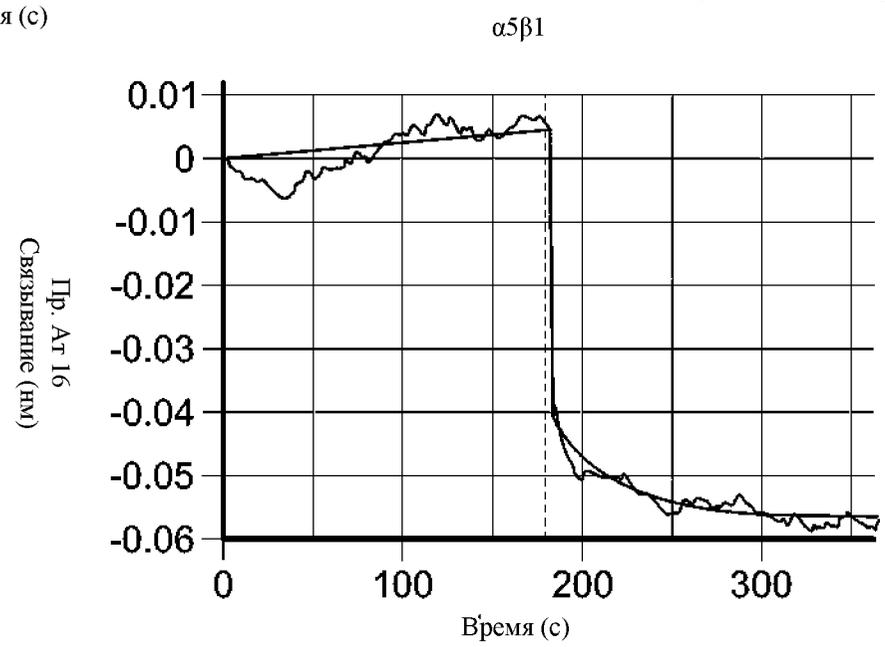
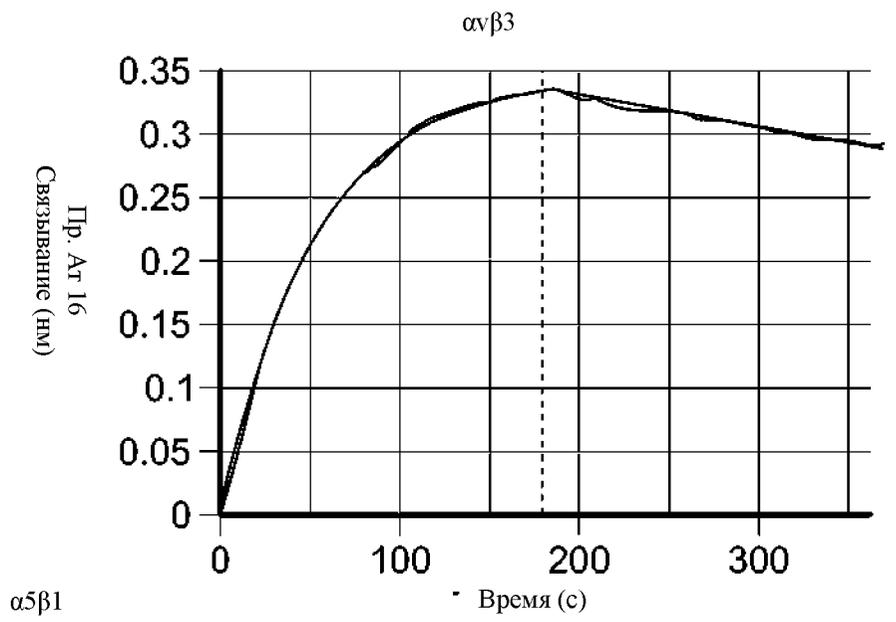
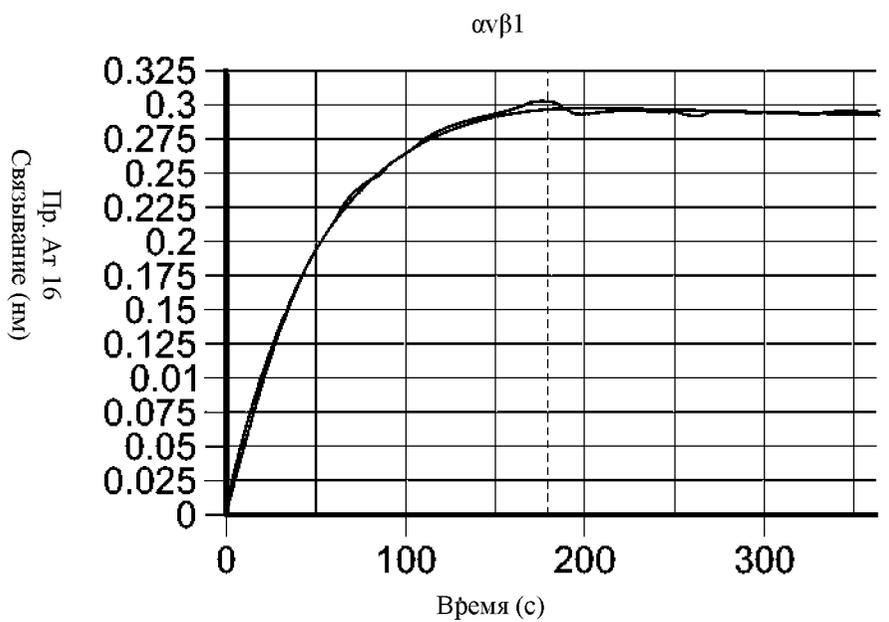
Фиг. 2К



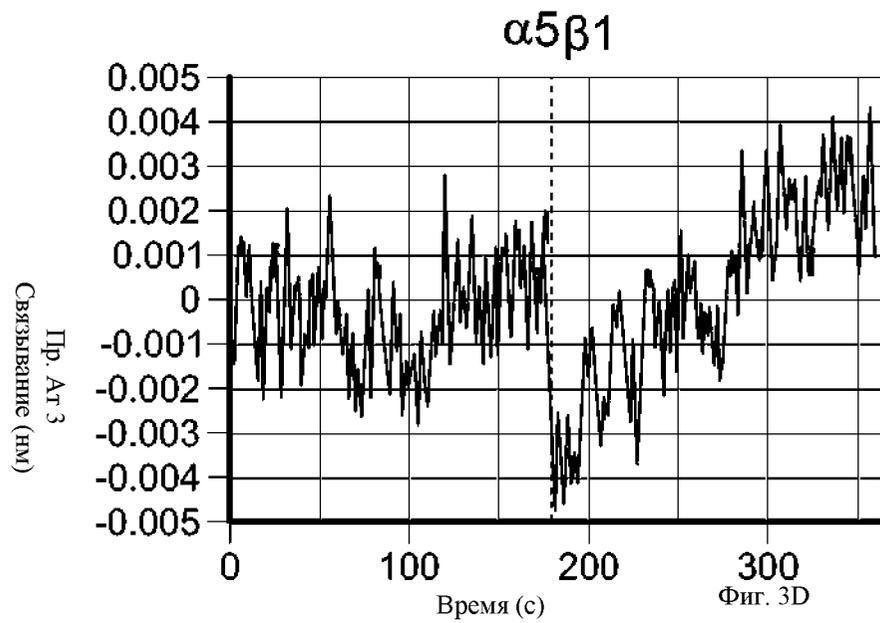
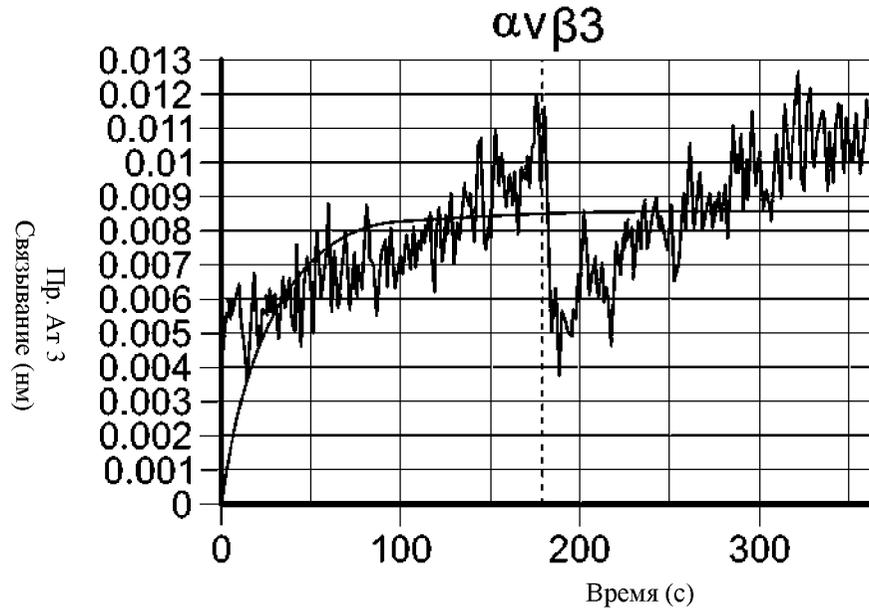
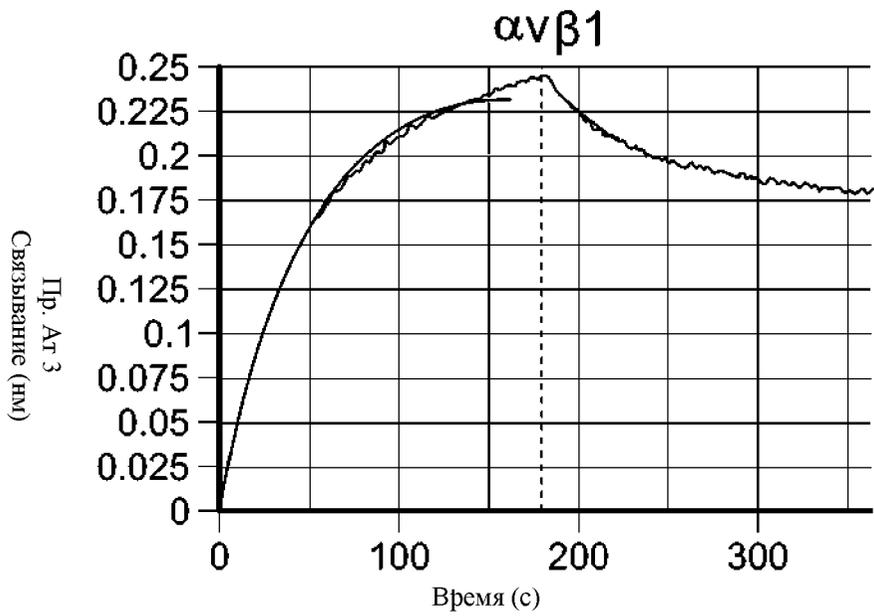
Фиг. 3А



Фиг. 3В



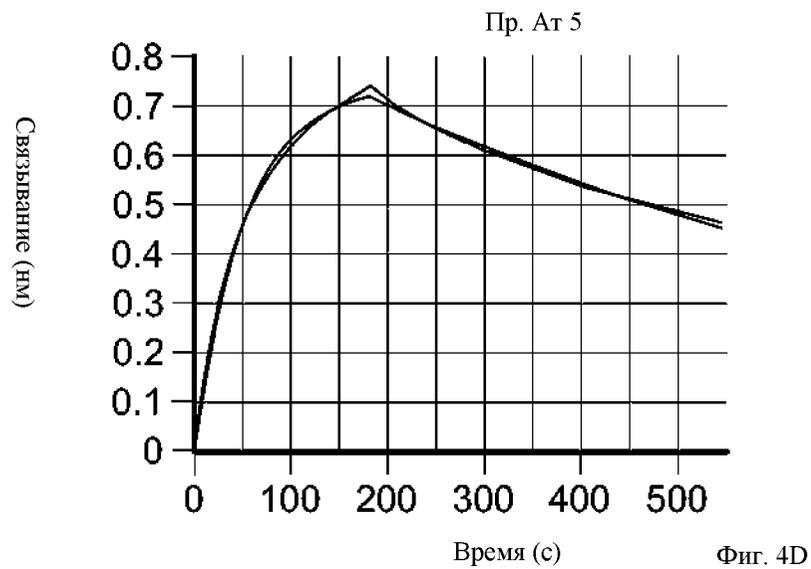
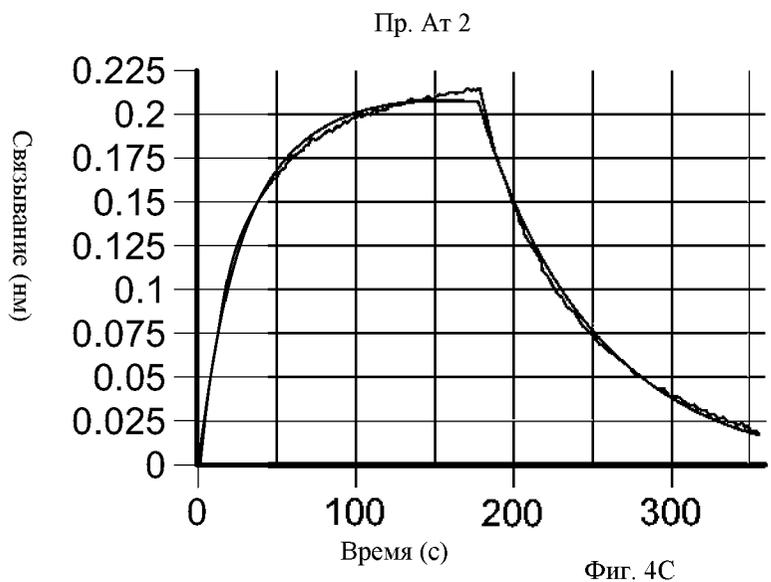
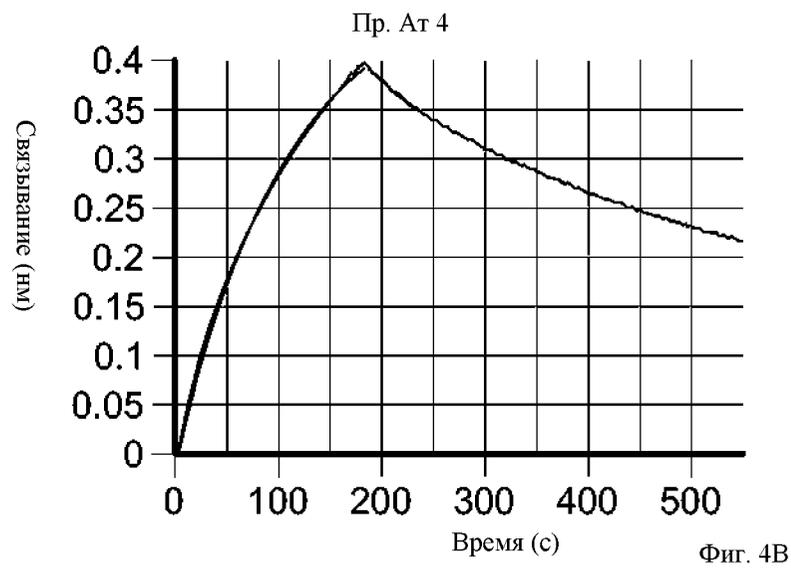
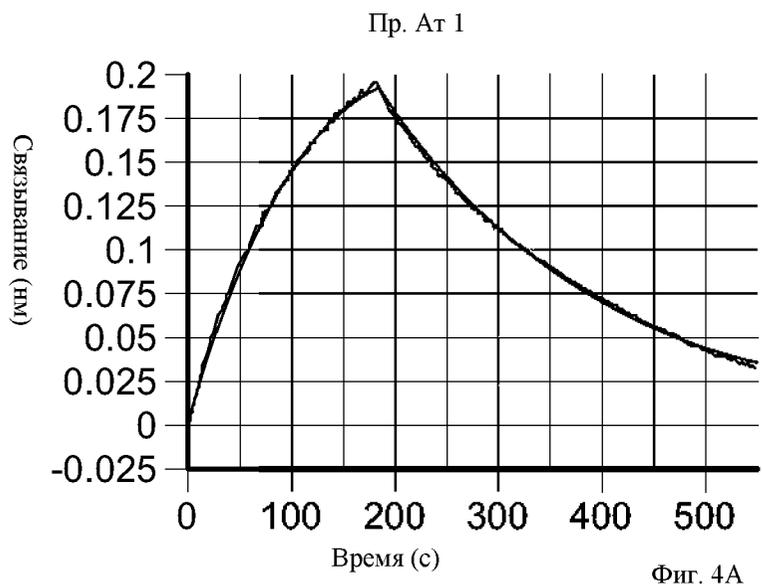
Фиг. 3С

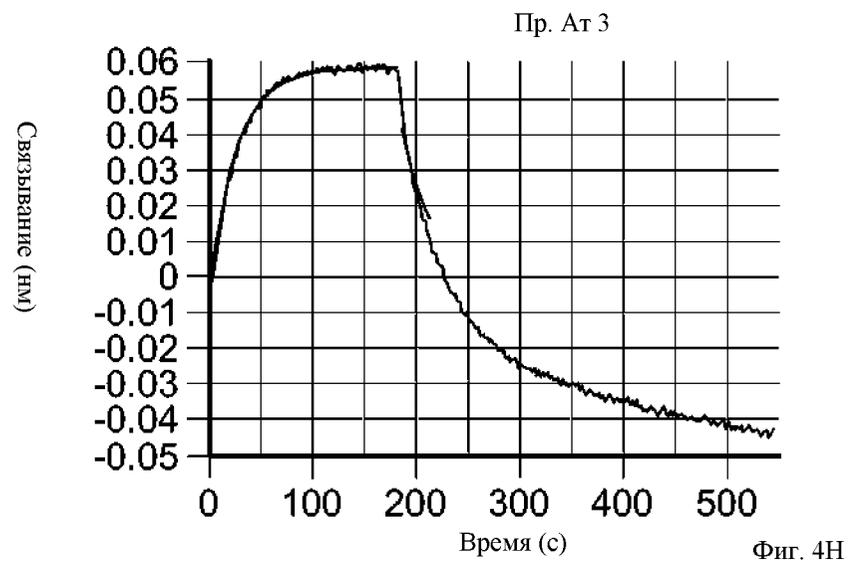
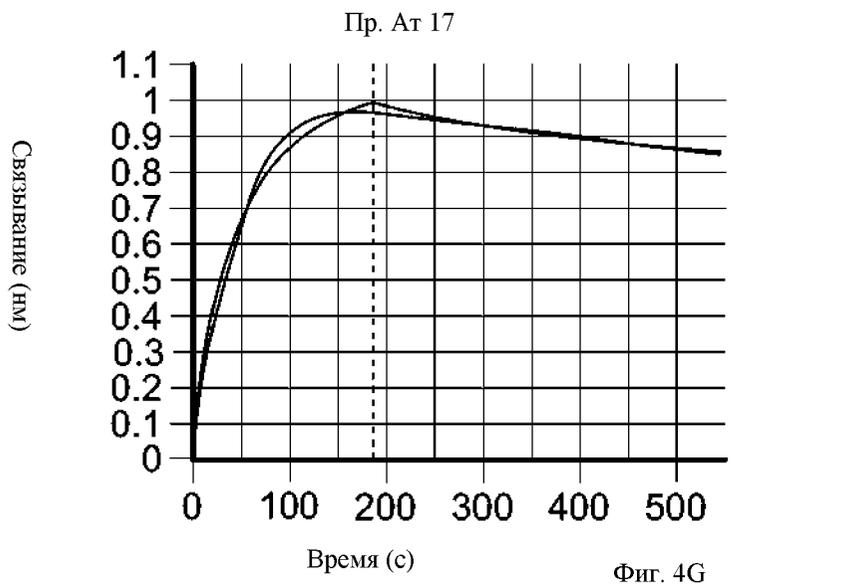
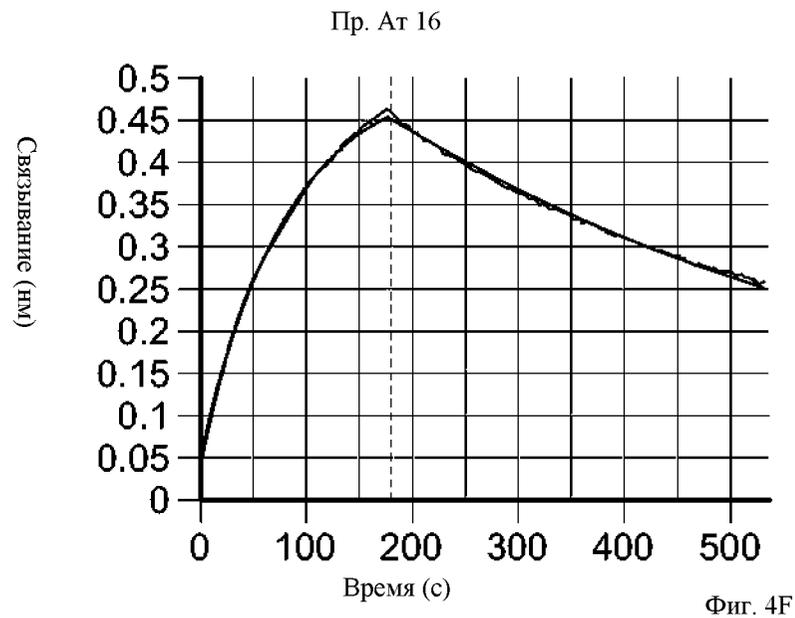
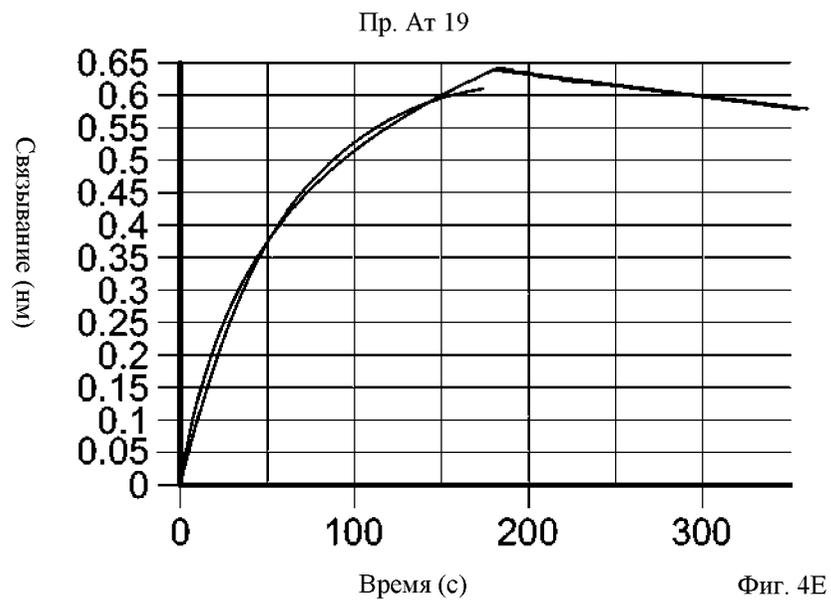


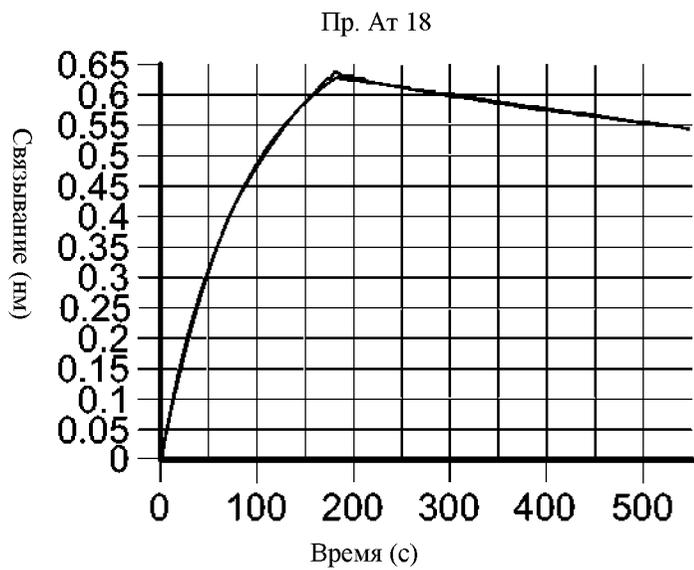
Ответный сигнал Octet

	Пр. Ат 1	Пр. Ат 2	Пр. Ат 16	Пр. Аб3
$\alpha\nu\beta 1$	0.26	0.24	0.30	0.24
$\alpha\nu\beta 3$	-0.01	0.00	0.33	0.01
$\alpha 5\beta 1$	0.01	0.01	0.01	0

Фиг. 3E



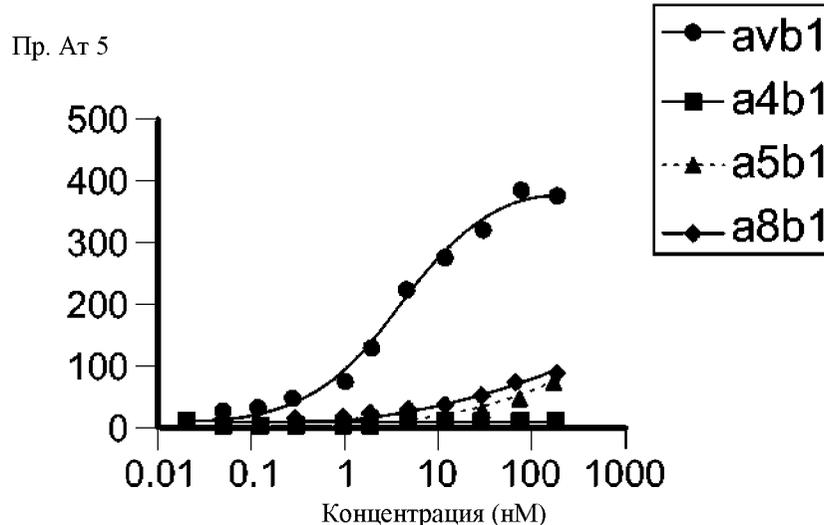
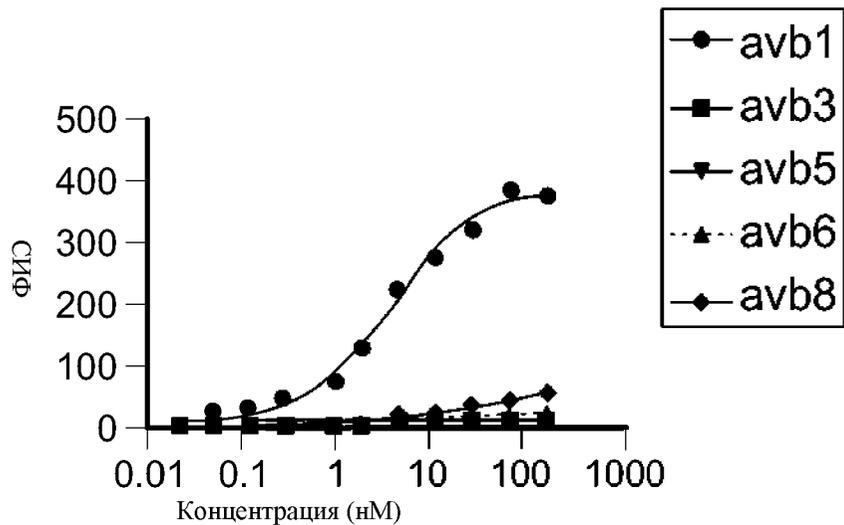




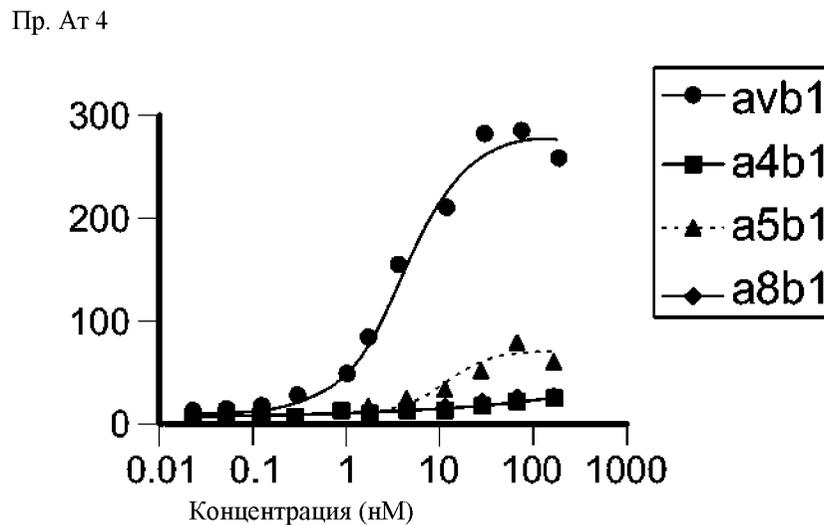
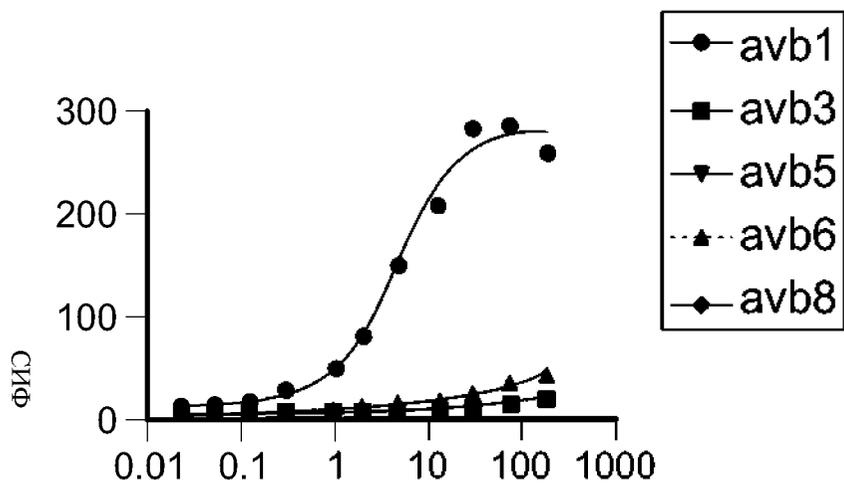
Фиг. 4I

	Пр. Ат 1	Пр. Ат 4	Пр. Ат 2	Пр. Ат 5	Пр. Ат 19	Пр. Ат 16	Пр. Ат 17	Пр. Ат 3	Пр. Ат 18
$\alpha\text{v}\beta 1$	68 нМ	26 нМ	150 нМ	5,4 нМ	6,5 нМ	13 нМ	1,2 нМ	2500 нМ	2,7 нМ

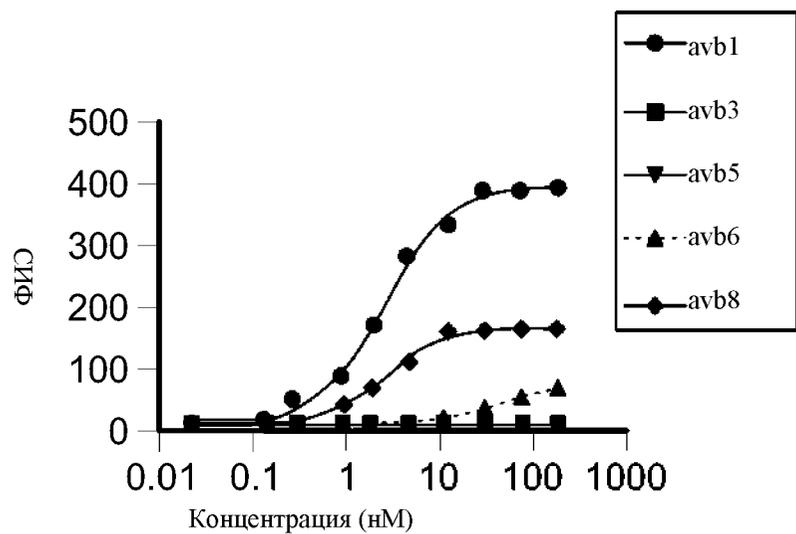
Фиг. 4J



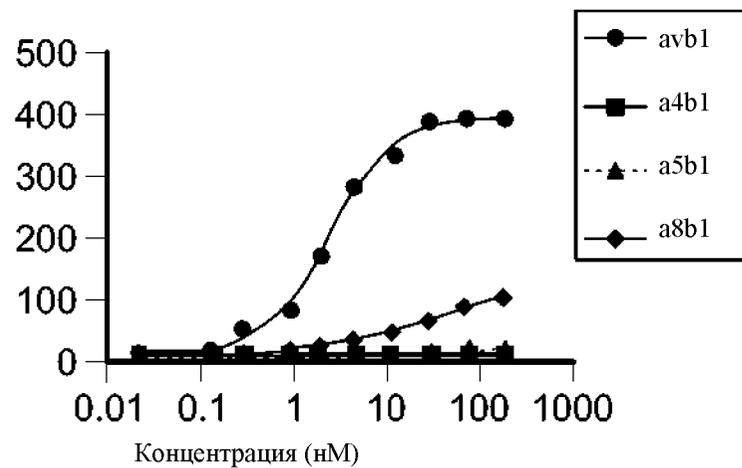
Фиг. 5А



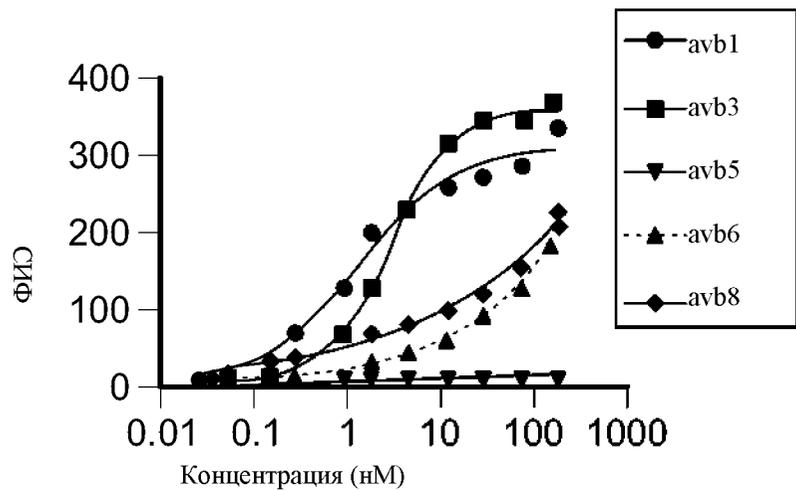
Фиг. 5В



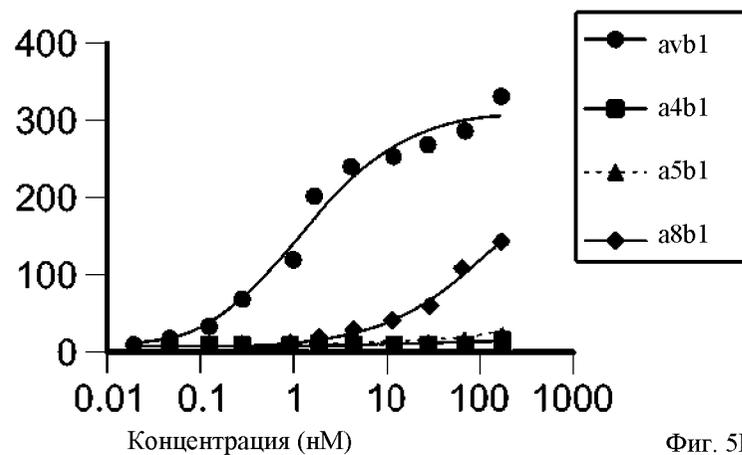
Пр. Ат 19



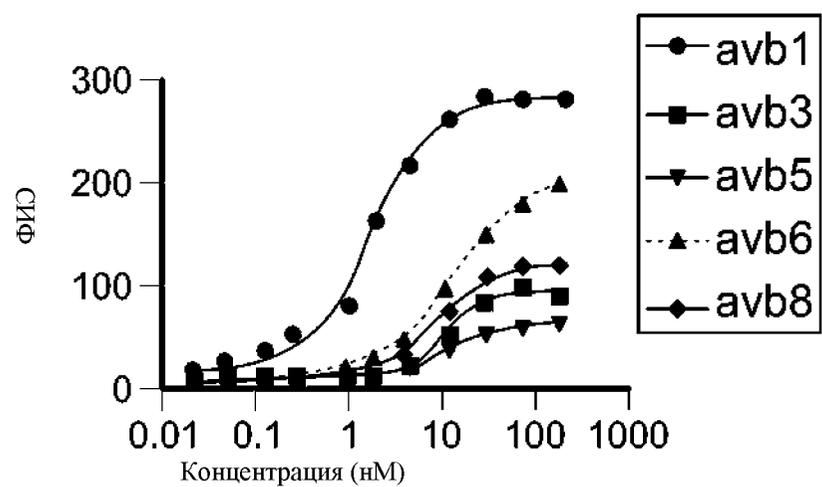
Фиг. 5С



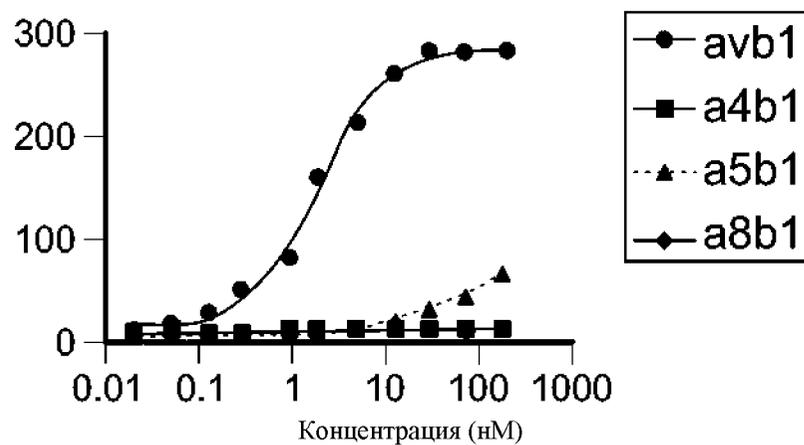
Пр. Ат 17



Фиг. 5D

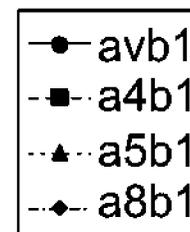
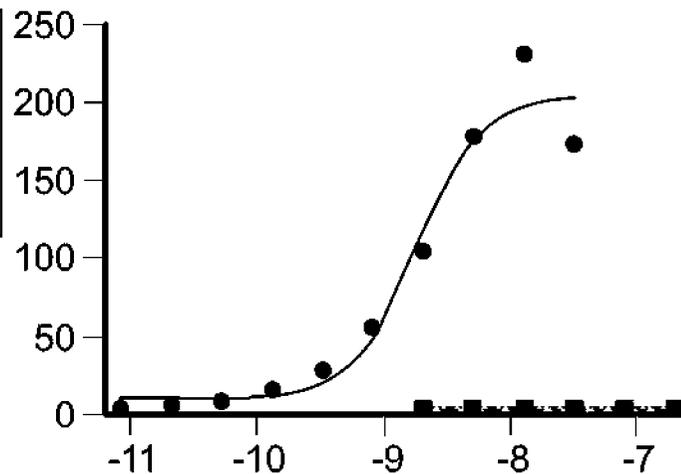
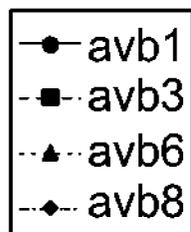
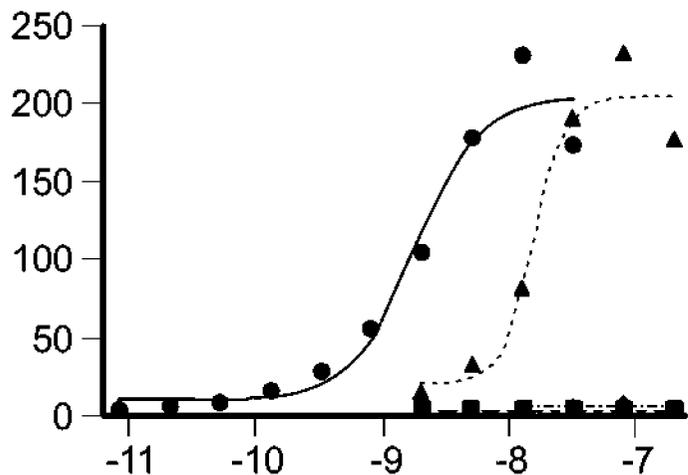


Пр. Ат 18



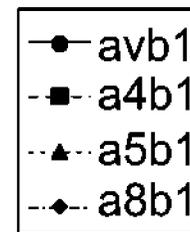
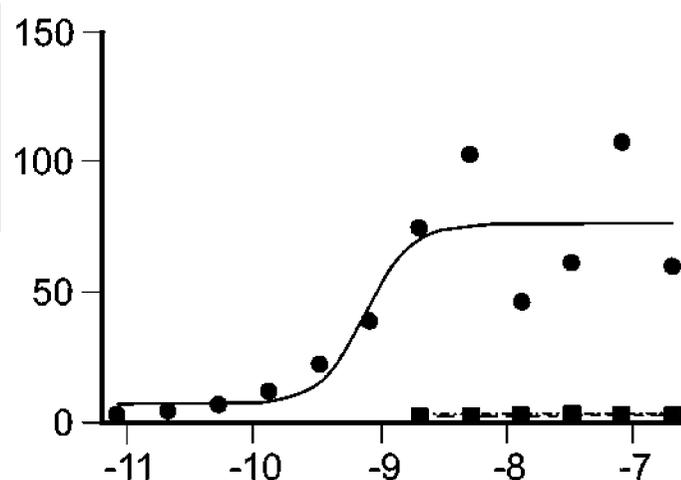
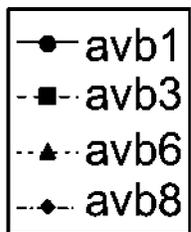
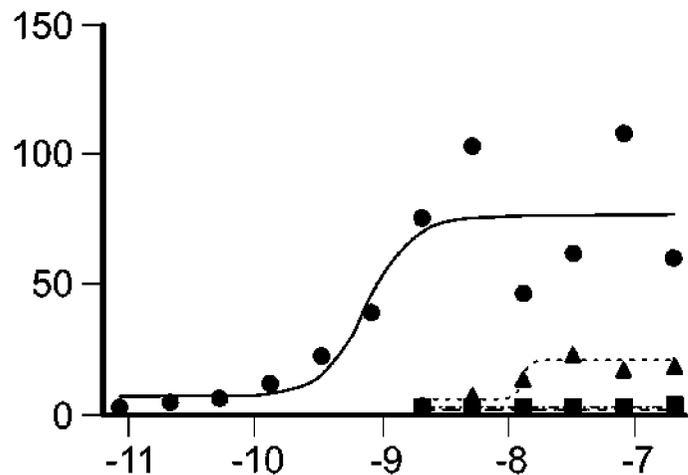
Фиг. 5E

Пр. Ат 11

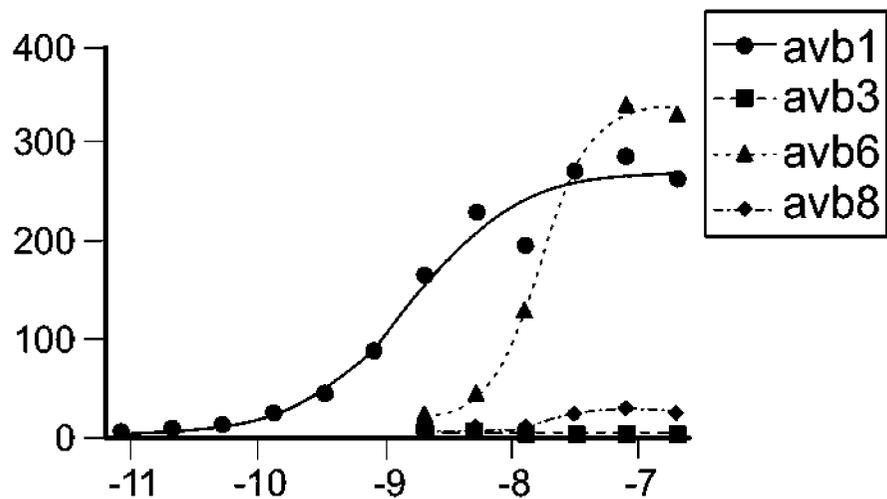


Фиг. 6А

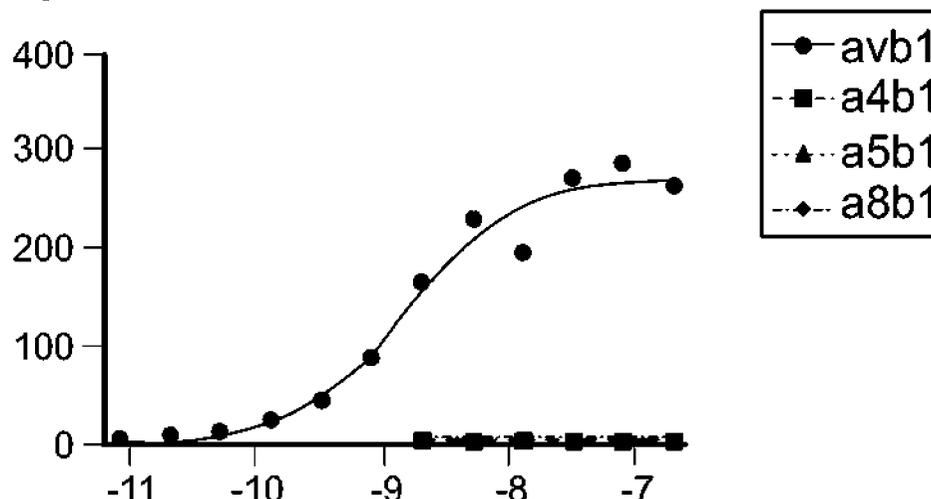
Пр. Ат 6



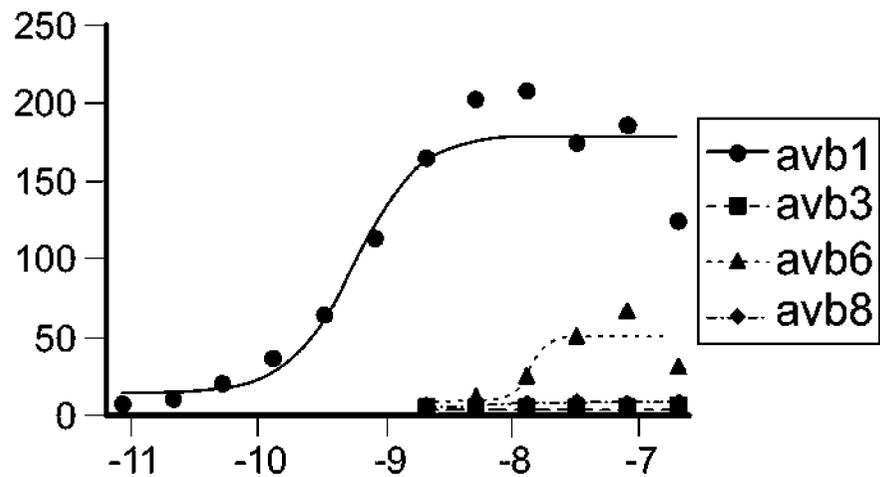
Фиг. 6В



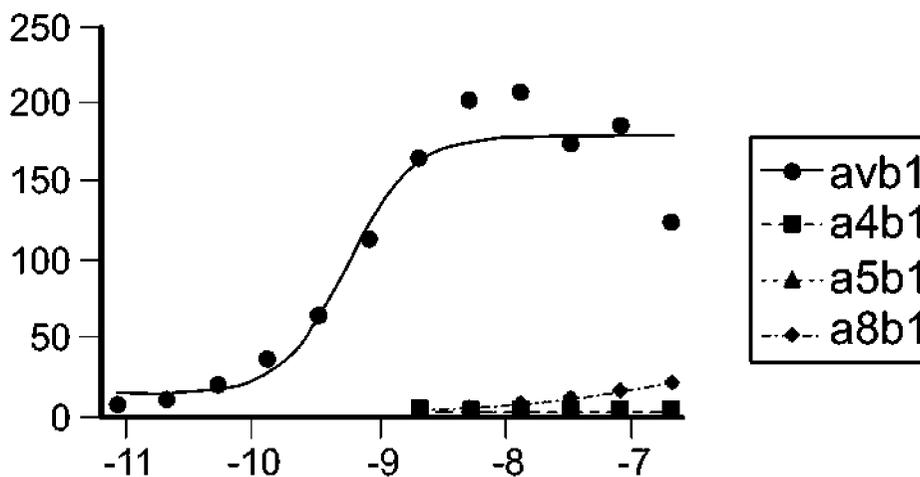
Пр. Ат 12



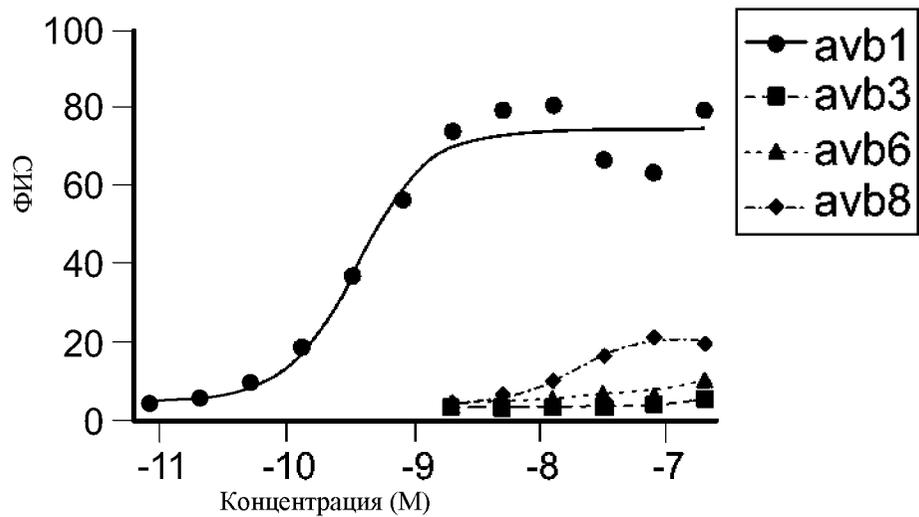
Фиг. 6С



Пр. Ат 13

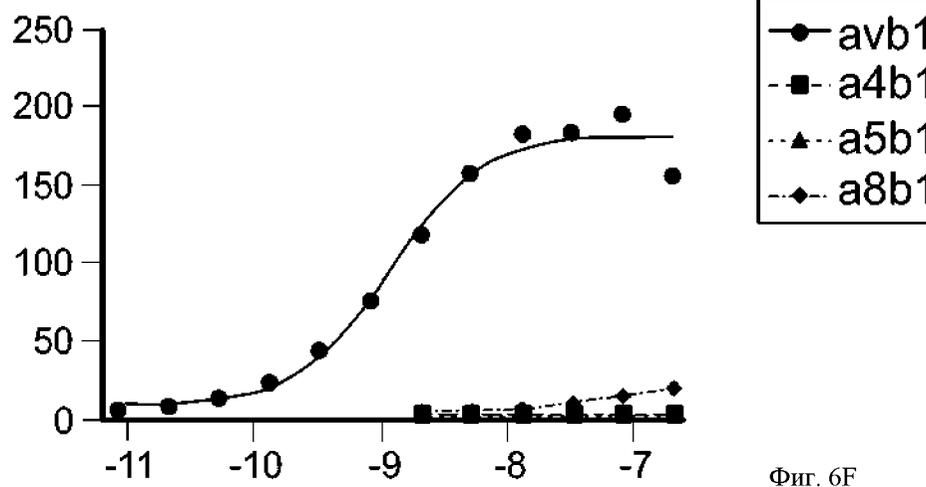
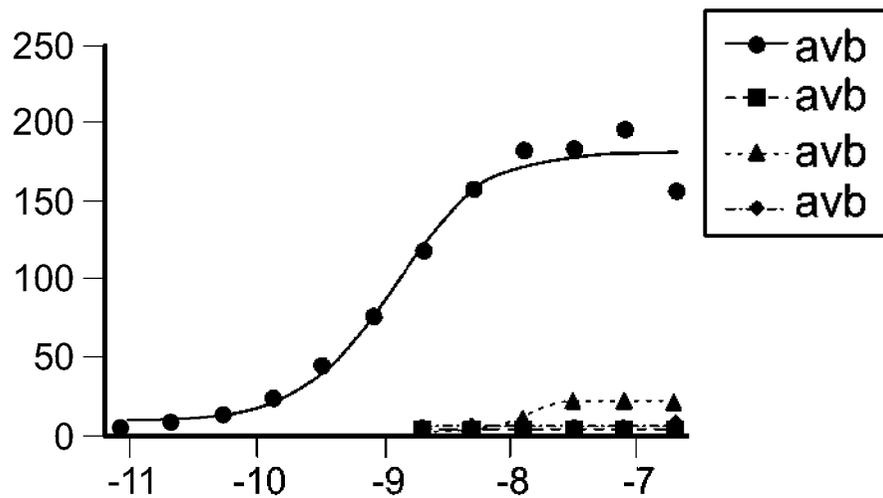


Фиг. 6D



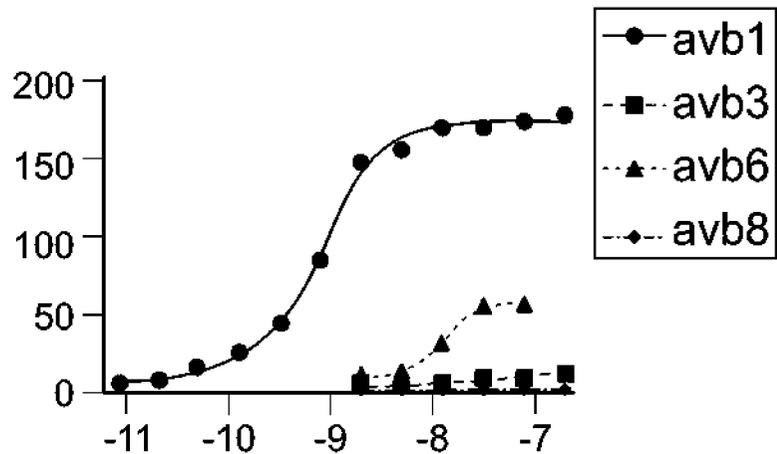
Фиг. 6E

Пр. Ат 20

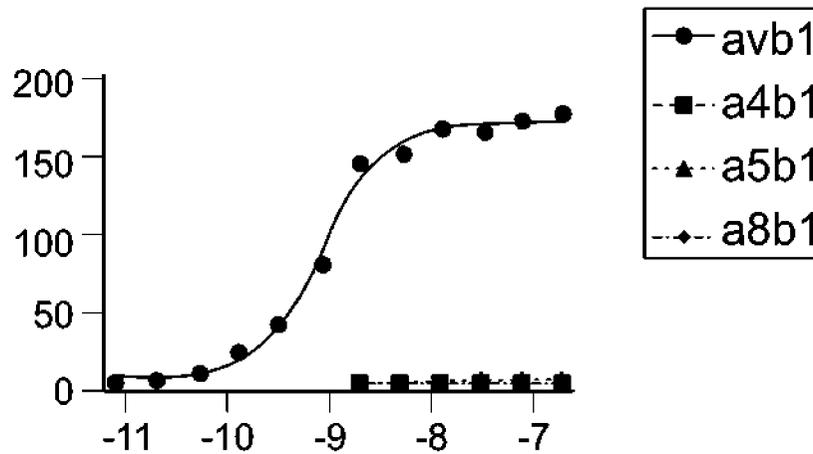


Фиг. 6F

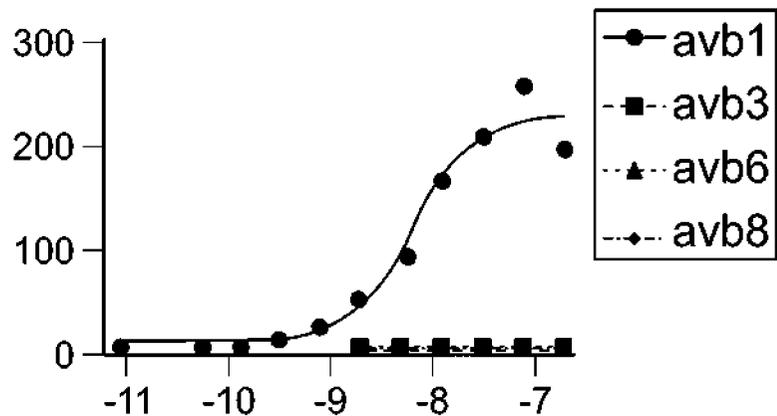
Пр. Ат 7



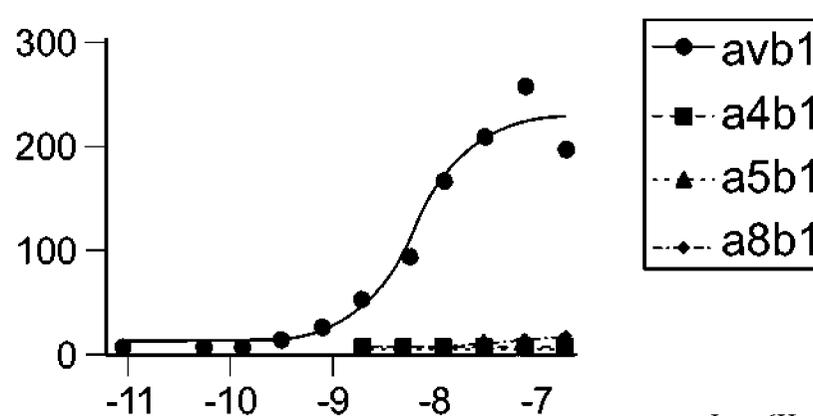
Пр. Ар 14



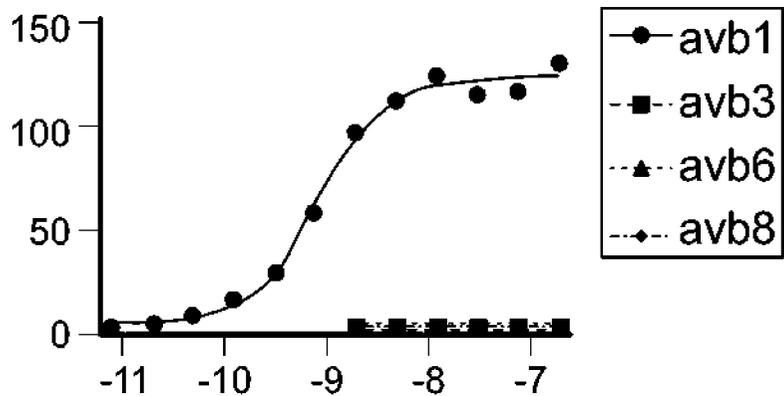
Фиг. 6G



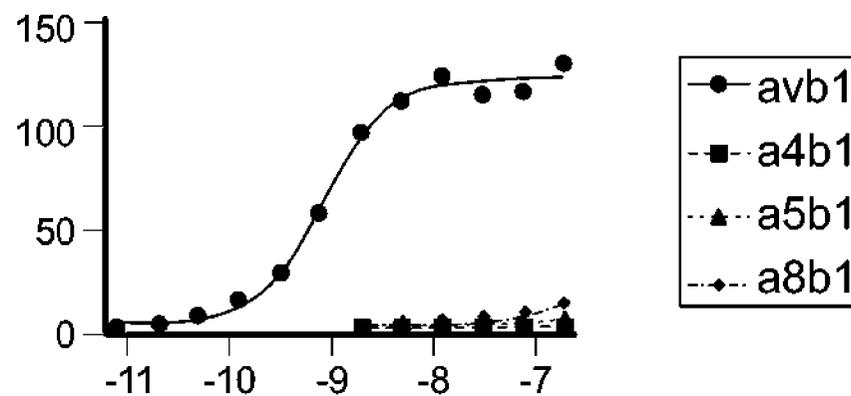
Пр. Ар 8



Фиг. 6H

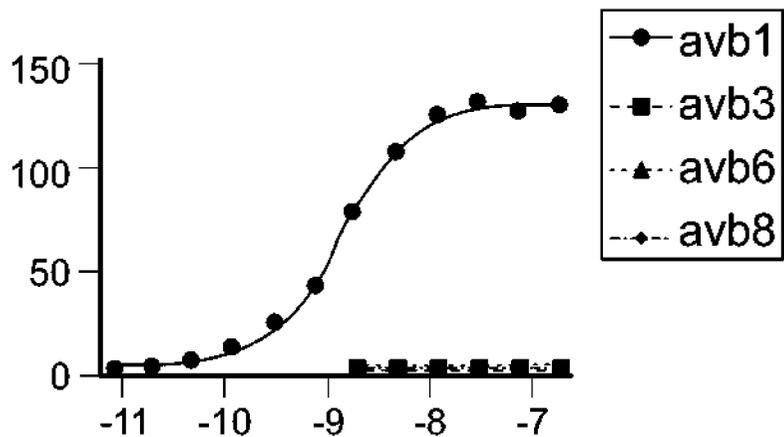


Пр. Ат 9

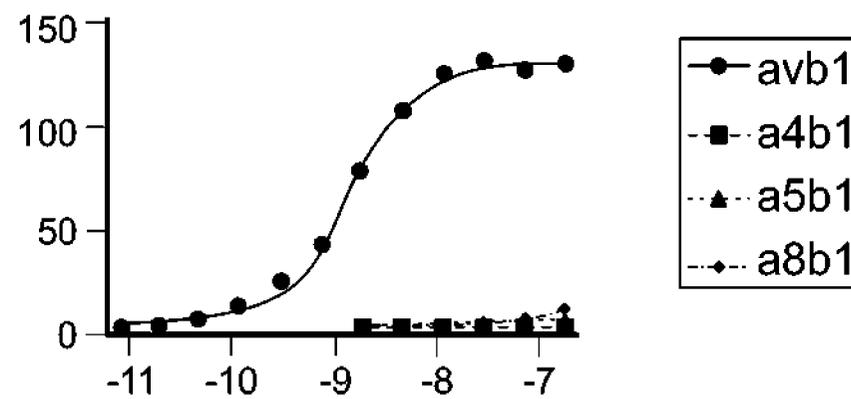


Фиг. 6I

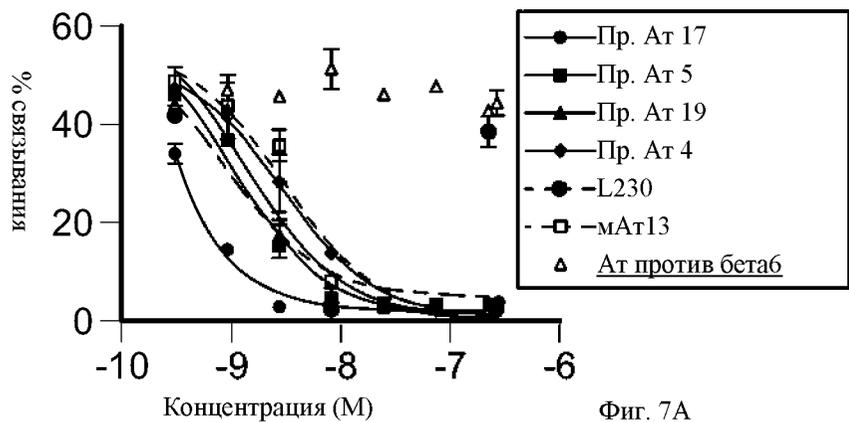
19/23



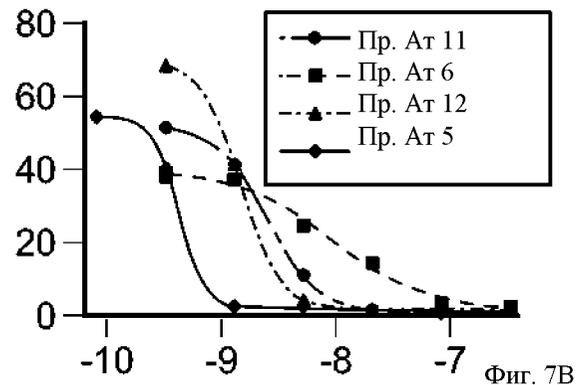
Пр. Ат 10



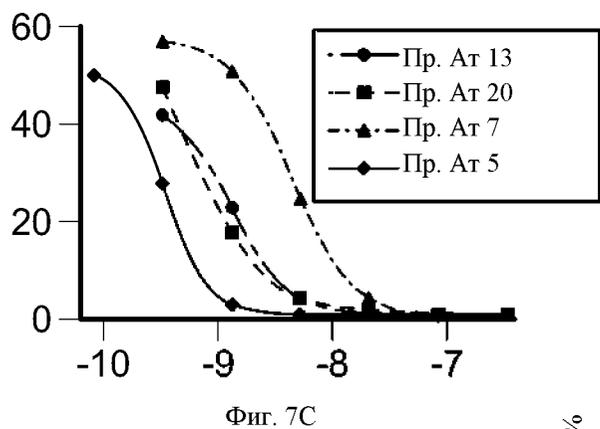
Фиг. 6J



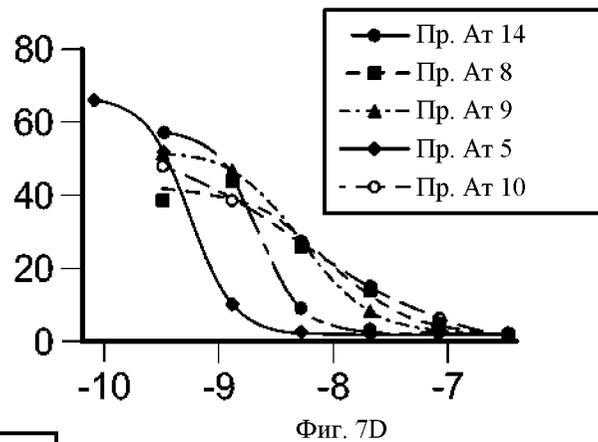
Фиг. 7А



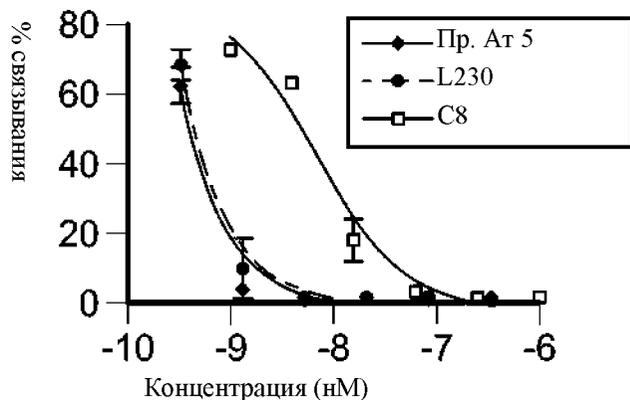
Фиг. 7В



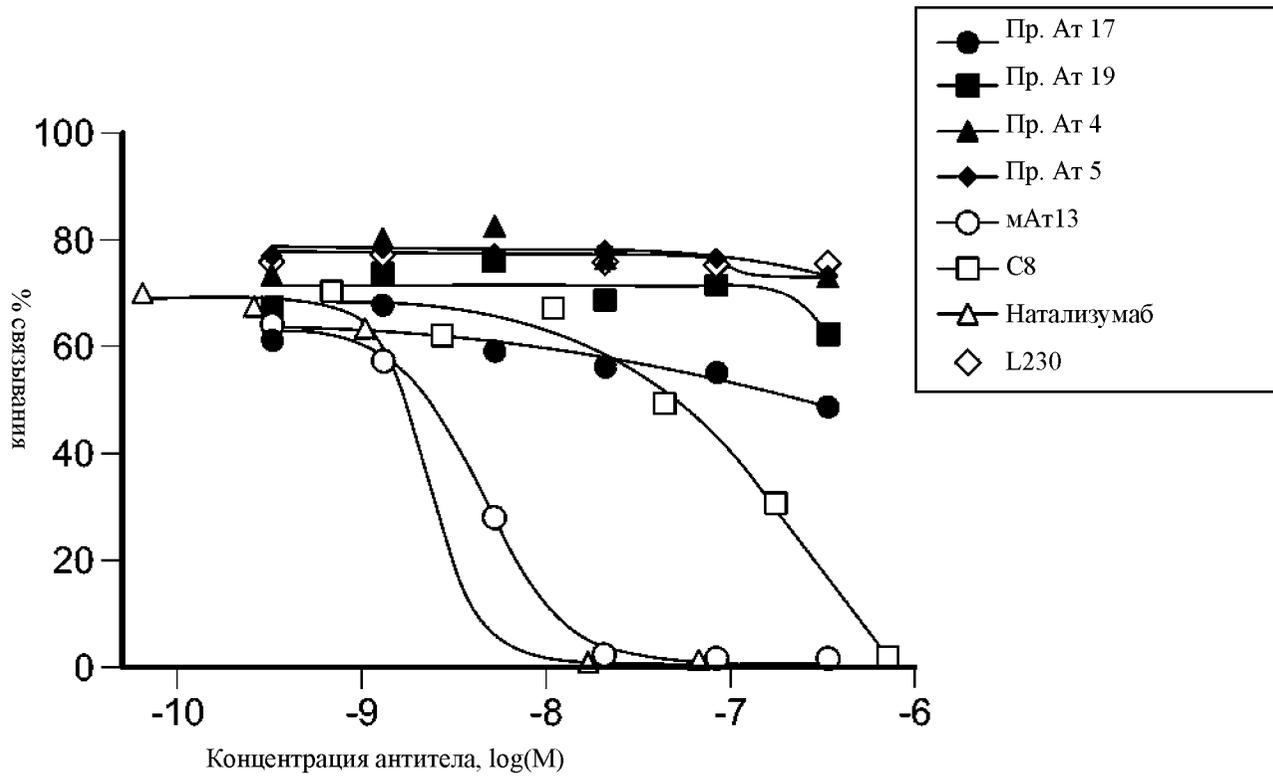
Фиг. 7С



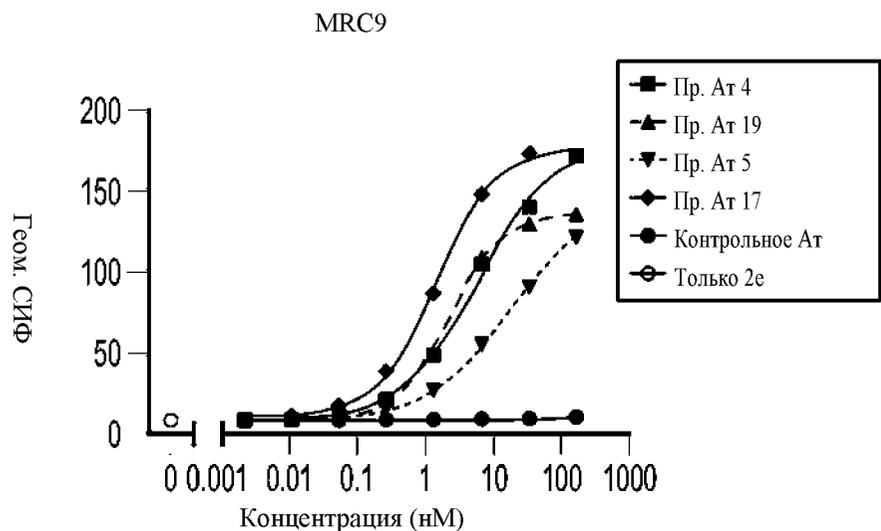
Фиг. 7D



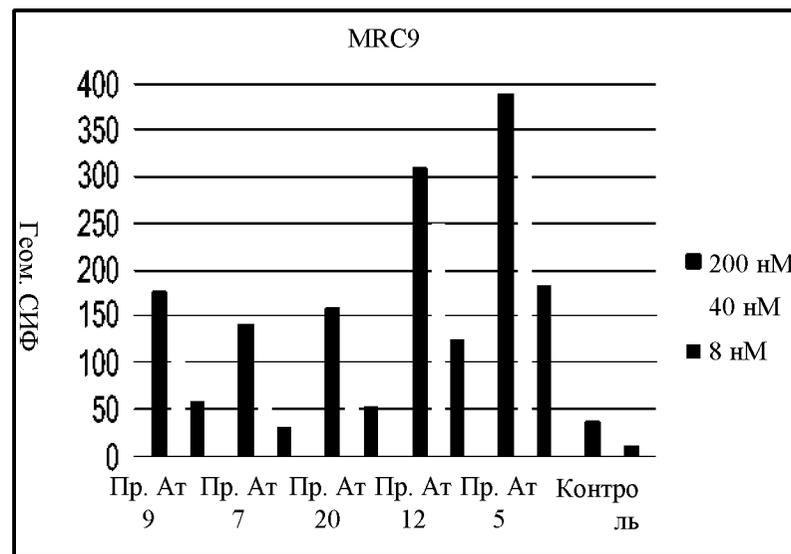
Концентрация (nM)



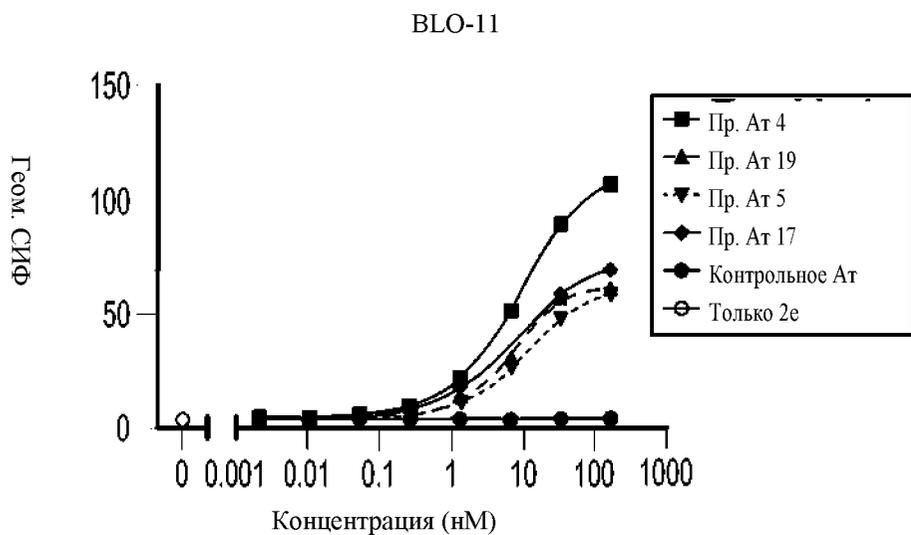
Фиг. 8



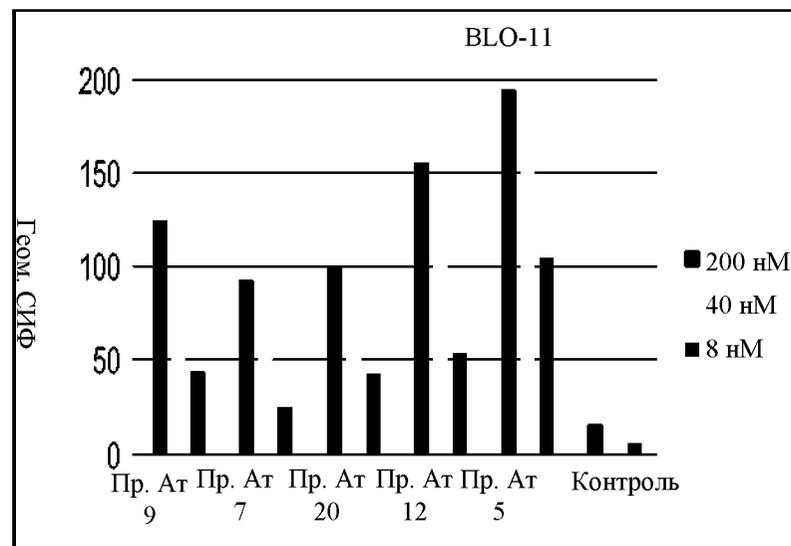
Фиг. 9А



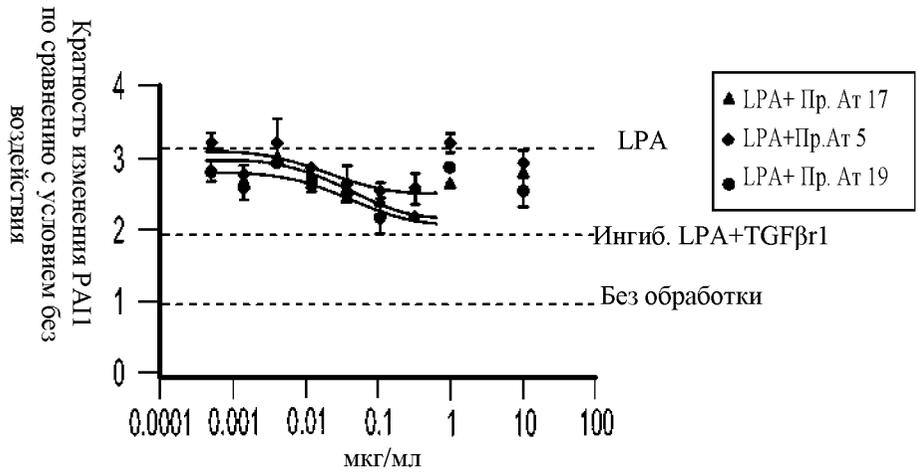
Фиг. 9С



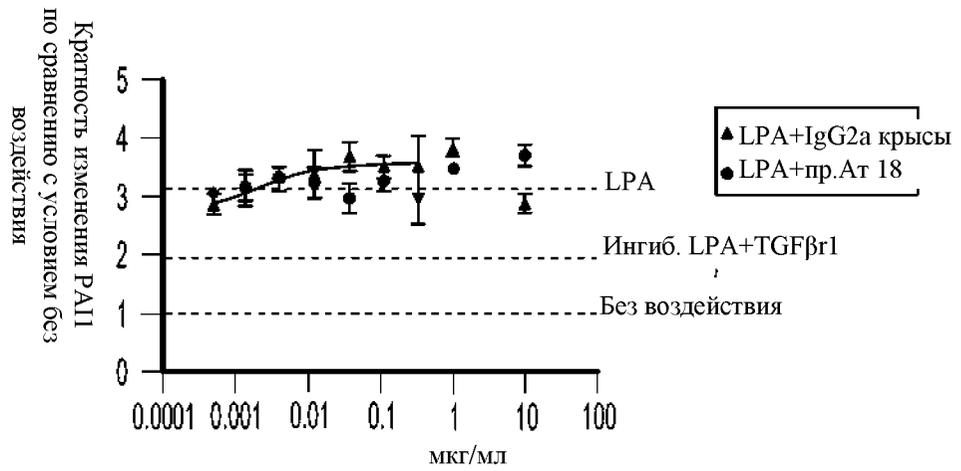
Фиг. 9В



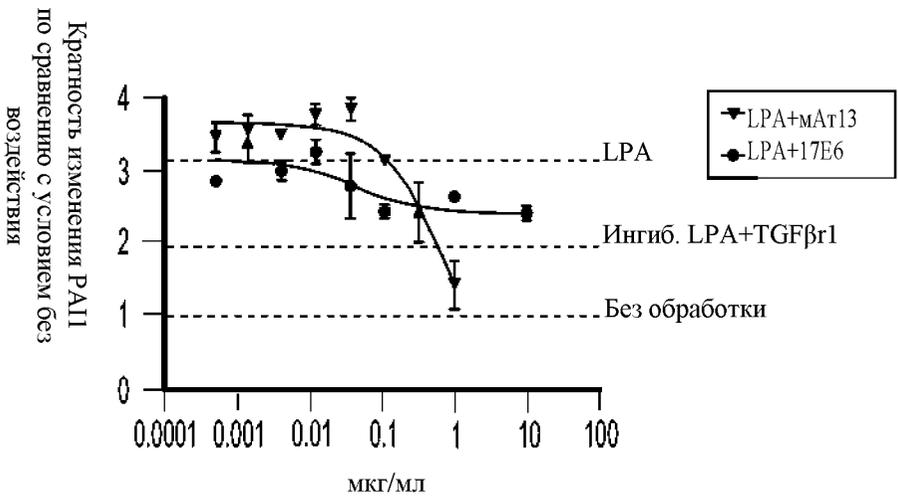
Фиг. 9D



Фиг. 10А



Фиг. 10С



Фиг. 10В