

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045239**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.11.07**

**(21)** Номер заявки  
**201991614**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.01.05**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/22** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)

---

**(54) СПЕЦИФИЧНЫЕ К ИЗОФОРМЕ, ПЕРМИССИВНЫЕ ПО ОТНОШЕНИЮ К КОНТЕКСТУ ИНГИБИТОРЫ TGFβ1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** 62/443,615; 62/452,866; 62/514,417;  
62/529,616; 62/549,767; 62/558,311;  
62/585,227; 62/587,964; 62/588,626  
**(32)** 2017.01.06; 2017.01.31; 2017.06.02;  
2017.07.07; 2017.08.24; 2017.09.13;  
2017.11.13; 2017.11.17; 2017.11.20

**(33)** US

**(43)** 2019.11.29

**(86)** PCT/US2018/012601

**(87)** WO 2018/129329 2018.07.12

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

**(72)** Изобретатель:  
Шурпф Томас, Датта Абхишек,  
Карвен Грегори Дж., Мартин  
Констанс, Калра Ашиш, Лонг  
Кимберли, Баклер Алан (US)

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

**(56)** WO-A1-2011102483  
N.N.: "Human LAP (TGF-beta  
1) Antibody", 1 January 1985  
(1985-01-01), XP055383034, Retrieved from the  
Internet: URL:https://resources.rndsystems.com/pdfs/  
datasheets/af-246-na.pdf [retrieved on 2017-06-20]  
page 1-2

WO-A2-2014182676

WO-A1-2013134365

WO-A1-2017156500

---

**(57)** В изобретении раскрыто терапевтическое применение специфичных к изоформе, пермиссивных по отношению к контексту ингибиторов TGFβ1 при лечении заболевания, которое включает в себя дисрегуляцию TGFβ1.

---

**B1**

**045239**

**045239**

**B1**

### Родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается преимущество и приоритет в соответствии с 35 U.S.C. § 119(e) следующих заявок: предварительная заявка США № 62/443615, поданная 6 января 2017 г.; предварительная заявка США № 62/452866, поданная 31 января 2017 г.; предварительная заявка США № 62/514417, поданная 2 июня 2017 г.; предварительная заявка США № 62/529616, поданная 7 июля 2017 г.; предварительная заявка США № 62/549767, поданная 24 августа 2017 г.; предварительная заявка США № 62/558311, поданная 13 сентября 2017 г.; предварительная заявка США № 62/582527, поданная 13 ноября 2017 г.; предварительная заявка США № 62/587964, поданная 17 ноября 2017 г., и предварительная заявка США № 62/588626, поданная 20 ноября 2017 г., содержание каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим полностью включен посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 5 января 2018 г., имеет имя 127036-02020\_ST25.txt и составляет 221821 байт.

### Предшествующий уровень техники изобретения

Суперсемейство трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ) факторов роста участвует в ряде сигнальных каскадов, которые регулируют разнообразные биологические процессы, включая в себя, без ограничения: ингибирование роста клеток, гомеостаз тканей, ремоделирование внеклеточного матрикса (ECM), эндотелиально-мезенхимальный переход (EMT), клеточную миграцию и инвазию и иммунную модуляцию/супрессию, а также мезенхимально-эпителиальный переход. В отношении ремоделирования ECM передача сигналов TGF $\beta$  может увеличивать популяции фибробластов и отложение ECM (например, коллагенов). В иммунной системе лиганд TGF $\beta$  модулирует T-регуляторную функцию клеток и поддерживает рост клеток-предшественников иммунных клеток и гомеостаз. В нормальных эпителиальных клетках TGF $\beta$  является мощным ингибитором роста и промотором клеточной дифференцировки. Однако, поскольку опухоли развиваются и прогрессируют, они часто теряют свою отрицательную реакцию роста на TGF $\beta$ . В этой ситуации TGF $\beta$  может стать промотором развития опухоли благодаря его способности стимулировать ангиогенез, изменять стромальное окружение и вызывать локальную и системную иммуносупрессию. По этим и другим причинам TGF $\beta$  был терапевтической мишенью по ряду клинических показаний. Несмотря на значительные усилия, предпринятые на сегодняшний день рядом групп, успешная клиническая разработка терапевтического TGF $\beta$  оказалась сложной задачей.

Наблюдения из доклинических исследований, в том числе на крысах и собаках, выявили определенные токсические эффекты, связанные с ингибированием TGF $\beta$  *in vivo*. Более того, хотя на сегодняшний день было разработано несколько ингибиторов TGF $\beta$ , большинство клинических программ, нацеленных на TGF $\beta$ , было прекращено из-за побочных эффектов (суммировано, например, в WO 2017/156500). Таким образом, несмотря на ряд прямых и косвенных доказательств, указывающих на участие передачи сигналов TGF $\beta$  в прогрессировании таких заболеваний, как рак и фиброз, на рынке нет доступных терапевтических средств TGF $\beta$ , которые были бы безопасными и эффективными.

Среди пролиферативных нарушений дисрегуляция TGF $\beta$  также участвует в миелофиброзе, который представляет собой нарушение костного мозга, характеризующееся клональной миелопролиферацией, aberrантным производством цитокинов, экстремедуллярным кроветворением и фиброзом костного мозга. Хотя соматические мутации в JAK2, MPL и CALR были выявлены в патогенезе заболевания, руксолитиниб (Jakafi), который является ингибитором JAK1/JAK2, одобренным FDA для лечения миелофиброза, не продемонстрировал эффективность в улучшении состояния установленного фиброза костного мозга у пациентов.

Таким образом, необходимы улучшенные способы и композиции для ингибирования передачи сигналов TGF $\beta$ , которые можно применять для эффективного и безопасного лечения заболеваний и нарушений, связанных с TGF $\beta$ 1, включая в себя, например, пролиферативные нарушения (например, рак), фиброз и воспаление.

### Краткое раскрытие изобретения

Настоящее изобретение охватывает признание того, что блокирование активации TGF $\beta$  в нескольких источниках может обеспечить более значительные клинические эффекты при лечении ряда заболеваний, включающих в себя как аспект ECM, так и иммунный аспект дисрегуляции TGF $\beta$ . Соответственно, в настоящем документе предложены улучшенные способы лечения таких заболеваний ингибиторами TGF $\beta$ 1 которые превосходят традиционные антагонисты TGF $\beta$  в отношении их селективности к изоформе, широте молекулярных мишеней в нише заболевания, продолжительности эффектов и безопасности.

Имеется совокупность доказательств того, что многие заболевания проявляют сложные нарушения передачи сигналов TGF $\beta$ , которые, вероятно, связаны с участием гетерогенных типов клеток, которые вызывают различные эффекты функции TGF $\beta$ , которые опосредуются его взаимодействиями с так называемыми презентующими молекулами. Было идентифицировано по меньшей мере четыре такие презентующие молекулы, которые могут «презентировать» TGF $\beta$  в различных внеклеточных нишах, что-

бы обеспечить его активацию в ответ на местные стимулы. В одной категории TGF $\beta$  депонируется в ECM в ассоциации с ECM-ассоциированными презентующими молекулами, такими как LTBP1 и LTBP3, которые опосредуют ECM-ассоциированные активности TGF $\beta$ . В другой категории TGF $\beta$  привязывается к поверхности иммунных клеток посредством презентующих молекул, таких как GARP и LRRC33, которые опосредуют определенную иммунную функцию. Эти презентующие молекулы демонстрируют дифференциальную экспрессию, локализацию и/или функцию в различных тканях и типах клеток, указывая на то, что запускающие события и исход активации TGF $\beta$  будут варьировать в зависимости от микроокружения. Исходя из представления о том, что многие эффекты TGF $\beta$  могут взаимодействовать и способствовать прогрессированию заболевания, терапевтические средства, которые могут противодействовать множественным аспектам функции TGF $\beta$ , могут обеспечивать большую эффективность.

Ранее авторы настоящего изобретения признавали, что специфичное к изоформе ингибирование (в отличие от пан-ингибирования) TGF $\beta$  может приводить к улучшению профилей безопасности противодействия TGF $\beta$  *in vivo* (смотрите WO 2017/156500). Принимая это во внимание, авторы настоящего изобретения стремились разработать ингибиторы TGF $\beta$ 1, которые как i) специфичны к изоформе, так и ii) способны к широкому нацеливанию на несколько сигнальных комплексов TGF $\beta$ 1, которые ассоциированы с различными презентующими молекулами, в качестве терапевтических средств для состояний, обусловленных многогранными эффектами TGF $\beta$ 1 и их дисрегуляцией.

Соответственно, настоящее раскрытие предоставляет специфичные к изоформе ингибирующие средства, способные нацеливаться как на ECM-ассоциированные TGF $\beta$ 1, так и на ассоциированные с иммунными клетками TGF $\beta$ 1, тем самым блокируя множество источников TGF $\beta$ 1, презентуемых в нескольких контекстах. Такие ингибирующие средства в настоящем документе упоминаются как "специфичные к изоформе, перmissive по отношению к контексту" ингибиторы TGF $\beta$ 1. В настоящем изобретении также предусмотрено применение этих средств в качестве терапевтического средства при лечении состояний, которые характеризуются дисрегуляцией передачи сигналов TGF $\beta$ 1, ассоциированной с множественными аспектами функции TGF $\beta$ 1. Такие ингибиторы могут функционировать как многофункциональные средства для противодействия множественным активностям TGF $\beta$ 1 (например, TGF $\beta$ 1 из множества источников или контекстов) для усиления клинических эффектов в контексте фиброза, миелофиброза, рака и других состояний.

Обоснование преимущественного применения перmissive по отношению к контексту (таких как независимых от контекста) ингибиторов TGF $\beta$ 1 по сравнению со специфичными к контексту ингибиторами TGF $\beta$ 1 в качестве терапевтического средства для лечения определенных заболеваний (как описано более подробно в настоящем документе) включает в себя следующее:

Вовлечение гетерогенных комплексов TGF $\beta$ 1 в окружение заболевания. Во-первых, различные заболевания включают в себя гетерогенные популяции клеток в качестве множества источников TGF $\beta$ 1, которые совместно способствуют патогенезу и/или прогрессированию заболевания. Более одного типа TGF $\beta$ 1-содержащих комплексов ("контекстов"), вероятно, сосуществуют в одном и том же микроокружении заболевания. В частности, такие заболевания могут включать в себя как компонент ECM передачи сигналов TGF $\beta$ 1, так и иммунный компонент передачи сигналов TGF $\beta$ 1. В таких ситуациях селективное нацеливание на один контекст TGF $\beta$ 1 (например, TGF $\beta$ 1, ассоциированный с одним типом презентующей молекулы) может давать ограниченное облегчение. Напротив, перmissive по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1 преимущественно предназначены для более широкого нацеливания на неактивные (про/латентные) комплексы TGF $\beta$ 1 и предотвращают активацию фактора роста в нескольких источниках до того, как зрелый TGF $\beta$ 1 может высвободиться для связывания с рецептором, чтобы инициировать дальнейшую передачу сигналов, сохраняя при этом селективность в отношении изоформы для минимизации токсичности.

Общие механизмы, лежащие в основе различных заболеваний. Во-вторых, между стромой опухоли и фиброзными тканями наблюдается заметное сходство тканевых/клеточных характеристик. Указывая на перекрестные помехи между и среди: i) TGF $\beta$ 1-зависимых профиброзных фенотипов; ii) TGF $\beta$ 1-зависимых проопухолевых фенотипов и iii) TGF $\beta$ -зависимых иммуносупрессивных фенотипов, наблюдаемых при ряде патологических состояний. Таким образом, применение перmissive по отношению к контексту ингибиторов, которые широко воздействуют на многие из этих компонентов, может обеспечить оптимальные терапевтические эффекты при различных типах патологических состояний. Например, клинические проявления первичного миелофиброза включают в себя аномальную пролиферацию определенных популяций клеток и фиброз в костном мозге.

Противодействие лекарственной резистентности. В-третьих, в ряде исследований сообщалось о раке/опухолях, которые резистентны к противораковой терапии, такой как ингибиторы иммунной контрольной точки. В некоторых случаях такая резистентность кажется присущей определенному типу рака/опухоли относительно клинического фона пациента (как правило, упоминается как истинная резистентность, первичная резистентность, внутренняя резистентность или истинная резистентность; эти

термины используются в настоящем документе взаимозаменяемо). Такая резистентность может быть представлена в группе пациентов, плохо отвечающих на лечение рака, такое как ингибиторы иммунной контрольной точки, и, возможно, отражает исключительное иммунное окружение. Это, вероятно, опосредовано, по меньшей мере частично, TGF $\beta$ 1-зависимым путем. Таким образом, описанный в настоящем документе селективный в отношении изоформы ингибитор может сделать резистентные злокачественные опухоли более восприимчивыми к таким способам лечения.

Альтернативно, резистентность может развиваться со временем, так что пациенты, которые проявляют существенный клинический ответ на лечение, становятся плохо отвечающими (т.е. адаптивная или приобретенная резистентность). Например, сообщалось, что терапия PD-1 может приводить к адаптивной резистентности, которая коррелирует с активацией других антигенов Т-клеток (например, компонентов TCR), предполагая, что раковые клетки эволюционируют, чтобы уклониться от блокады PD-1 через другой механизм. Впоследствии второй ингибитор контрольной точки, нацеленный на другой компонент рецептора Т-клеток, такой как TIM3, может восстановить чувствительность к иммунотерапии. Эти наблюдения показывают, что блокирование нескольких путей противодействия адаптивным реакциям раковых клеток может снизить вероятность того, что раковые клетки смогут избежать иммунитета хозяина. Пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1, которые способны нацеливаться на множественные контексты TGF $\beta$ 1, могут преимущественно обходить приобретенную лекарственную резистентность путем обеспечения блокады в нескольких точках функции TGF $\beta$ 1.

Выдерживание пластичности экспрессии: и, наконец, на основе представления о том, что экспрессия различных презентующих молекул может изменяться во времени, например, в ответ на местные сигналы (например, цитокины, хемокины, среду ECM и т.д.) и/или с изменениями в микроокружении заболевания, обосновано, что пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1, такие как описанные в настоящем документе, могут применяться для того, чтобы противостоять такой пластичности и обеспечивать широкие, длительные ингибирующие эффекты, даже когда происходят аномальные изменения в экспрессии презентующих молекул.

В любом из этих сценариев пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1 преимущественно нацелены на про/латентные формы TGF $\beta$ 1 в сочетании с различными презентующими молекулами, все из которых или различные комбинации которых присутствуют в микроокружении(ях) заболевания. Более конкретно, в одном способе ингибитор нацелен на ECM-ассоциированный TGF $\beta$ 1 (комплексы LTBP1/3-TGF $\beta$ 1). В другом способе ингибитор нацелен на ассоциированный с иммунными клетками TGF $\beta$ 1. Это включает в себя GARP-презентируемый TGF $\beta$ 1, такой как комплексы GARP-TGF $\beta$ 1, экспрессируемые на клетках Treg, и комплексы LRRC33-TGF $\beta$ 1, экспрессируемые на макрофагах и других миелоидных/лимфоидных клетках, а также некоторых раковых клетках.

Такие антитела включают в себя специфичные к изоформе ингибиторы TGF $\beta$ 1, которые связывают и предотвращают активацию (или высвобождение) зрелого фактора роста TGF $\beta$ 1 из про/латентного комплекса TGF $\beta$ 1 пермиссивным по отношению к контексту (или независимым от контекста) образом, так что антитела могут ингибировать активацию (или высвобождение) TGF $\beta$ 1, ассоциированного с несколькими типами презентующих молекул. В частности, в настоящем изобретении предложены антитела, способные блокировать по меньшей мере один контекст ECM-ассоциированного TGF $\beta$ 1 (презентируемого LTBP и/или презентуемого LTBP3), и по меньшей мере один клеточно-ассоциированный TGF $\beta$ 1 (презентируемый GARP и/или презентуемый LRRC33).

Было предложено, чтобы различные заболевания включают в себя нарушение регуляции передачи сигналов TGF $\beta$  в качестве способствующего фактора. Действительно, патогенез и/или прогрессирование определенных состояний человека, по-видимому, преимущественно обусловлено или зависит от активности TGF $\beta$ 1. В частности, многие такие заболевания и нарушения, по-видимому, включают в себя как компонент ECM, так и иммунный компонент функции TGF $\beta$ 1, что позволяет предположить, что вовлечена активация TGF $\beta$ 1 в нескольких контекстах (например, опосредованных более чем одним типом презентующих молекул). Кроме того, предполагается, что между отвечающими на TGF $\beta$ 1 клетками существует перекрестная связь. В некоторых случаях взаимодействие между многогранными активностями оси TGF $\beta$ 1 может привести к прогрессированию заболевания, обострению и/или супрессии способности хозяина бороться с заболеванием. Например, определенное микроокружение заболевания, такое как опухолевое микроокружение (TME), может быть ассоциировано с TGF $\beta$ 1, презентуемыми множеством различных презентующих молекул, например, LTBP1-про-TGF $\beta$ 1, LTBP3-про-TGF $\beta$ 1, GARP-про-TGF $\beta$ 1, LRRC33-про-TGF $\beta$ 1 и любыми их комбинациями. Активности TGF $\beta$ 1 одного контекста могут, в свою очередь, регулировать или влиять на активности TGF $\beta$ 1 другого контекста, что повышает вероятность того, что при нарушении регуляции это может привести к обострению патологических состояний. Следовательно, желательно широко ингибировать во многих режимах функцию TGF $\beta$ 1 (т.е. в нескольких контекстах), при этом избирательно ограничивая такие ингибирующие эффекты изоформой TGF $\beta$ 1. Цель состоит не в том, чтобы нарушать гомеостатическую передачу сигналов TGF $\beta$ , опосредованную другими изоформами, включая в себя TGF $\beta$ 3, которая играет важную роль в заживлении ран.

Чтобы решить эту проблему, авторы настоящего изобретения попытались создать специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1, которые могут быть особенно применимы для терапевтического применения при лечении заболеваний, которые обусловлены или зависят от передачи сигналов или нарушения регуляции TGF $\beta$  1. Подход, принятый для соответствия критериям для таких ингибиторов, заключается в следующем: i) способность ингибировать передачу сигналов TGF $\beta$ 1 специфичным к изоформе образом (без вмешательства в активности TGF $\beta$ 2 и/или TGF $\beta$ 3); и, ii) способность ингибировать как ЕСМ-ассоциированную, так и ассоциированную с иммунными клетками передачу сигналов TGF $\beta$ 1. Обоснование этого подхода заключается в том, чтобы сбалансировать эффективность (и, следовательно, клиническую эффективность) ингибирования TGF $\beta$ 1 против потенциальной токсичности. Более конкретно, достижение селективности по отношению к TGF $\beta$ 1 в терапевтической дозировке по сравнению с другими изоформами направлено на уменьшение или минимизацию возможных токсических эффектов (например, нежелательных побочных эффектов и нежелательных явлений), ассоциированных с пан-ингибированием TGF $\beta$  *in vivo*, некоторые из которых могут потребоваться для нормальной биологической функции (такие как заживление ран). С другой стороны, включение множества контекстов TGF $\beta$ 1 в качестве терапевтической мишени направлено на обеспечение или оптимизацию клинической эффективности при заболевании, которое включает в себя нарушение регуляции множества аспектов передачи сигналов TGF $\beta$ 1. Различные варианты осуществления клинического применения и схемы лечения охватываются настоящим изобретением.

Соответственно, согласно одному аспекту в настоящем документе представлены специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1, характеризующиеся тем, что такие ингибиторы обладают способностью ингибировать как ЕСМ-ассоциированную передачу сигналов TGF $\beta$ 1, так и ассоциированную с иммунными клетками передачу сигналов TGF $\beta$ 1. В частности, такие ингибиторы могут блокировать TGF $\beta$ 1, презентуемый в нескольких контекстах, т.е. активности TGF $\beta$ 1, опосредованные двумя или более типами презентующих молекул, при этом сохраняя активность TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3 в неизменном виде. Таким образом, активности TGF $\beta$ 1, которые могут ингибироваться такими ингибиторами, включают в себя две или более из следующих: i) передача сигналов TGF $\beta$ 1, ассоциированная с презентуемым GARP TGF $\beta$ 1; ii) передача сигналов TGF $\beta$ 1, ассоциированная с презентуемым LRRC33 TGF $\beta$ 1; iii) передача сигналов TGF $\beta$ 1, ассоциированная с презентуемым LTBP1 TGF $\beta$ 1; и iv) передача сигналов TGF $\beta$ 1, ассоциированная с презентуемым LTBP3 TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы нацелены по меньшей мере на две или по меньшей мере на три пробелковые формы следующих комплексов: i) TGF $\beta$ 1-GARP; ii) TGF $\beta$ 1-LRRC33; iii) TGF $\beta$ 1-LTBP1 и iv) TGF $\beta$ 1-LTBP3. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы представляют собой моноклональные антитела, которые специфично связывают и ингибируют i) TGF $\beta$ 1-GARP; ii) TGF $\beta$ 1-LTBP1 и iv) TGF $\beta$ 1-LTBP3. Согласно некоторым вариантам осуществления такие моноклональные антитела специфично связывают и ингибируют ii) TGF $\beta$ 1-LRRC33; iii) TGF $\beta$ 1-LTBP1 и iv) TGF $\beta$ 1-LTBP3. Согласно некоторым вариантам осуществления такие моноклональные антитела специфично связывают и ингибируют i) TGF $\beta$ 1-GARP; ii) TGF $\beta$ 1-LRRC33 и iii) TGF $\beta$ 1-LTBP1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие моноклональные антитела специфично связывают и ингибируют i) TGF $\beta$ 1-GARP; ii) TGF $\beta$ 1-LRRC33 и iv) TGF $\beta$ 1-LTBP3. Согласно некоторым вариантам осуществления такие моноклональные антитела специфично ингибируют все следующие комплексы: i) TGF $\beta$ 1-GARP; ii) TGF $\beta$ 1-LRRC33; iii) TGF $\beta$ 1-LTBP1 и iv) TGF $\beta$ 1-LTBP3. Согласно некоторым вариантам осуществления такие моноклональные антитела не связывают зрелый TGF $\beta$ 1, который представляет собой свободный TGF $\beta$ 1 (например, фактор роста, который высвобождается или не образует комплекс с презентующей молекулой). Аспект настоящего изобретения включает в себя композиции, содержащие такой ингибитор, в том числе, например, фармацевтические композиции, которые подходят для введения подвергаемым лечению субъектам-людям и отличным от людей субъектам. Такие фармацевтические композиции, как правило, являются стерильными. Согласно некоторым вариантам осуществления такие фармацевтические композиции могут также содержать по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, такое как буфер и поверхностно-активное вещество (например, полисорбаты). Наборы, содержащие такую фармацевтическую композицию, также охватываются настоящим изобретением.

Описанные в настоящем документе специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы являются подходящими для применения при лечении заболевания или нарушения, включающего в себя множественные биологические функции TGF $\beta$ 1 и его дисрегуляции. В частности, такое заболевание или нарушение включает в себя как компонент ЕСМ функции TGF $\beta$ 1, так и иммунный компонент функции TGF $\beta$ 1. Следовательно, введение такого ингибитора может ингибировать каждую ось сигнального пути TGF $\beta$ 1 *in vivo*, например, множественные мишени TGF $\beta$ 1, ассоциированные с заболеванием или нарушением, усиливая терапевтические эффекты. Соответственно, согласно другому аспекту настоящее изобретение включает в себя терапевтическое применение таких ингибиторов в способе лечения субъекта, который страдает от заболевания, ассоциированного с дисрегуляцией TGF $\beta$ 1.

Специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту или независимые от контекста ингибиторы передачи сигналов TGF $\beta$ 1 особенно подходят для лечения заболевания, которое обусловлено или зависит от множества функций (например, как компонента ECM, так и иммунного компонента) TGF $\beta$ 1. Как правило, такие заболевания включают в себя несколько типов клеток или статус клеток, в которых TGF $\beta$ 1 представлен множеством типов презентующих молекул (например, в нескольких контекстах).

Согласно связанному аспекту в настоящем изобретении представлены способы скрининга, получения и изготовления специфичных к изоформе, пермиссивных по отношению к контексту ингибиторов TGF $\beta$ 1 с улучшенным профилем безопасности (например, сниженной токсичностью *in vivo*). Такие способы требуют, чтобы потенциальные средства исследовали и отбирали в отношении специфичности к изоформе TGF $\beta$ 1, например, потенциальные средства выбирают для ингибирующих активностей в отношении передачи сигналов TGF $\beta$ 1, а не передачи сигналов TGF $\beta$ 2 и/или TGF $\beta$ 3. В соответствии с настоящим изобретением такие специфичные к изоформе ингибиторы активностей TGF $\beta$ 1 могут ингибировать множественные контексты функции TGF $\beta$ 1 (смотрите ниже).

Согласно некоторым вариантам осуществления такими средствами являются антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связывают и блокируют активацию TGF $\beta$ 1, но не TGF $\beta$ 2 и/или TGF $\beta$ 3. Согласно некоторым вариантам осуществления такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты не связывают свободный зрелый фактор роста TGF $\beta$ 1, который не ассоциирован с про/латентным комплексом. Таким образом, соответствующие способы получения могут предусматривать стадию скрининга, на которой оценивают потенциальные средства (такие как потенциальные антитела или их фрагменты) на их способность ингибировать TGF $\beta$ 1, который ассоциирован с конкретными презентующими молекулами, например, GARP, LRRC33, LTBP1 и/или LTBP3. Согласно некоторым вариантам осуществления неактивный (например, латентный) комплекс-предшественник, такой как GARP-про-TGF $\beta$ 1, LRRC33-про-TGF $\beta$ 1, LTBP1-про-TGF $\beta$ 1 и LTBP3-про-TGF $\beta$ 1, можно использовать для анализа для активации зрелого активного фактора роста TGF $\beta$ 1. Активация TGF $\beta$ 1 в присутствии или в отсутствие исследуемого средства (т.е. потенциального ингибитора) может быть измерена любыми подходящими средствами, включая в себя, без ограничения, анализы *in vitro* и клеточные анализы. Аналогичная стадия скрининга может быть использована для исследования специфичности изоформы с использованием аналогов TGF $\beta$ 2 и/или TGF $\beta$ 3. Такая стадия скрининга может быть проведена для идентификации потенциальных средств (таких как потенциальные антитела или их фрагменты) на их способность ингибировать передачу сигналов TGF $\beta$ 1: i) специфичным к изоформе образом и ii) пермиссивным по отношению к контексту или независимым от контекста способом.

Некоторые заболевания ассоциированы с дисрегуляцией множества биологических ролей передачи сигналов TGF $\beta$ , которые не ограничиваются одним контекстом функции TGF $\beta$ . В таких ситуациях может быть полезно модулировать эффекты TGF $\beta$  в нескольких контекстах, вовлеченных в начало и/или в течение прогрессирования заболевания. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам нацеливания и широкого ингибирования множества контекстов TGF $\beta$ 1, но специфичным к изоформе образом. Такие средства в настоящем документе упоминаются как "специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту" ингибиторы TGF $\beta$ 1. Таким образом, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1 нацелены на множество контекстов (например, на несколько типов комплексов про/латентный-TGF $\beta$ 1). Предпочтительно такие ингибиторы нацелены по меньшей мере на один тип (или "контекст") преактивационного комплекса TGF $\beta$ 1, который является ECM-ассоциированным (т.е. на про/латентный комплекс TGF $\beta$ 1, презентуемый ECM-ассоциированной презентующей молекулой), и дополнительно по меньшей мере на один тип (или "контекст") преактивационного комплекса TGF $\beta$ 1, ассоциированного с клеточной поверхностью (т.е. про/латентный комплекс TGF $\beta$ 1, презентуемый клеточно-или мембрано-ассоциированной презентующей молекулой). Согласно некоторым вариантам осуществления пермиссивные по отношению к контексту модуляторы TGF $\beta$ 1 нацелены на все типы про/латентных комплексов TGF $\beta$ 1 (например, GARP-ассоциированный, LRRC33-ассоциированный, LTBP-ассоциированный и т.д.), чтобы охватить все контексты независимо от конкретной презентующей молекулы(молекул).

Хотя пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1 способны нацеливаться более чем на один тип комплексов про/латентных-TGF $\beta$ 1 (т.е. с разными презентующими молекулами), согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы могут отдавать предпочтение (или демонстрировать смещение по отношению к) одному или нескольким контекстам над другим(и). Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления пермиссивное по отношению к контексту антитело, которое ингибирует активацию TGF $\beta$ 1, может преимущественно ингибировать активацию TGF $\beta$ 1, опосредованную одной презентующей молекулой, по отношению к другой презентующей молекуле, даже если такое антитело способно связываться с обоими типами пролатентных комплексов. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело представляет собой моноклональное антитело, которое связывает и ингибирует активацию LTBP1/3-ассоциированного TGF $\beta$ 1, GARP-ассоциированного

TGF $\beta$ 1 и LRRC33-ассоциированного TGF $\beta$ 1, но с преимущественной ингибирующей активностью в отношении LTBP1/3-ассоциированного TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело представляет собой моноклональное антитело, которое связывает и ингибирует активацию LTBP1-ассоциированного TGF $\beta$ 1, LTBP3-ассоциированного TGF $\beta$ 1, GARP-ассоциированного TGF $\beta$  и LRRC33-ассоциированного TGF $\beta$ 1, но с преимущественной ингибирующей активностью в отношении LTBP1- и LTBP3-ассоциированного TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело представляет собой моноклональное антитело, которое связывает и ингибирует активацию LTBP 1-ассоциированного TGF $\beta$ 1, LTBP3-ассоциированного TGF $\beta$ 1, GARP-ассоциированного TGF $\beta$ 1 и LRRC33-ассоциированного TGF $\beta$ 1, но с преимущественной ингибирующей активностью в отношении GARP-ассоциированного TGF $\beta$ 1 и LRRC33-ассоциированного TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело представляет собой моноклональное антитело, которое связывает и ингибирует активацию GARP-ассоциированного TGF $\beta$ 1 и LRRC33-ассоциированного TGF $\beta$ 1, но с преимущественной ингибирующей активностью в отношении GARP-ассоциированного TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело представляет собой моноклональное антитело, которое связывает и ингибирует активацию GARP-ассоциированного TGF $\beta$ 1 и LRRC33-ассоциированного TGF $\beta$ 1, но с преимущественной ингибирующей активностью в отношении LRRC33-ассоциированного TGF $\beta$ 1.

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением могут быть созданы различные степени селективности для нацеливания на подмножество эффектов TGF $\beta$ . Специфичные к изоформе ингибиторы TGF $\beta$  (которые нацелены на единственную изоформу TGF $\beta$ ) обеспечивают более высокую селективность, чем так называемые ингибиторы пан-TGF $\beta$  (которые нацелены на множественные или все изоформы TGF $\beta$ ).

Настоящее изобретение включает в себя применение таких ингибиторов TGF $\beta$ 1 в способах лечения заболевания, ассоциированного с дисрегуляцией TGF $\beta$ 1. Применение таких ингибиторов особенно выгодно в условиях, когда изоформа TGF $\beta$ 1 играет доминирующую роль (по сравнению с TGF $\beta$ 2/3) в развитии заболевания, и когда заболевание включает в себя как компонент ECM, так и иммунный компонент передачи сигналов TGF $\beta$ 1. Этот подход направлен на сохранение нормальных или гомеостатических функций TGF $\beta$ , в то же время преимущественно направленно воздействуя на функцию TGF $\beta$ , ассоциированную с заболеванием.

Такой ингибитор предпочтительно представляет собой ингибитор активации TGF $\beta$ 1 (т.е. ингибитор стадии активации TGF $\beta$ 1). Согласно предпочтительным вариантам осуществления такой ингибитор способен к нацеливанию на неактивные формы TGF $\beta$ 1 (например, про/латентные-TGF $\beta$ 1 комплексы) до активации, чтобы обеспечить более длительное ингибирование по сравнению с нацеливанием на временную, уже активированную, растворимую/свободную форму фактора роста, который был высвобожден из латентного комплекса. Определение источника/контекста ассоциированного с заболеванием TGF $\beta$ 1 может быть осуществлено с использованием антител, которые специфично связываются с латентным комплексом TGF $\beta$ 1, который включает в себя представляющую интерес презентующую молекулу (например, GARP, LRRC33, LTBP1, LTBP3 и т.д.).

Аспекты настоящего изобретения относятся к иммуноглобулинам, таким как антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфично связывают по меньшей мере три из следующих комплексов: комплекс GARP-TGF $\beta$ 1, комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1 и комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1. В соответствии с настоящим изобретением такие иммуноглобулины специфично связывают по меньшей мере один тип ECM-ассоциированных (например, ECM-связанных) комплексов TGF $\beta$ 1 (например, LTBP1- и/или LTBP3-ассоциированных комплексов TGF $\beta$ 1) и по меньшей мере один тип клеточно-ассоциированных (например, связанных с поверхностью клетки) комплексов TGF $\beta$ 1, (например, GARP-ассоциированных и/или LRRC33-ассоциированных комплексов TGF $\beta$ 1) для осуществления широкого ингибирующего действия на множество контекстов. Описанные в настоящем документе антитела или их антигенсвязывающие части специфично связываются с эпитопом TGF $\beta$ 1 (например, LAP) или компонентом(ами) белкового комплекса, содержащего TGF $\beta$ 1 (например, LAP), который доступен для связывания антителами или их антигенсвязывающими частями, когда TGF $\beta$ 1 присутствует в комплексе GARP-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или LRRC33-TGF $\beta$ 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп доступен для связывания антителом, когда TGF $\beta$ 1 присутствует в двух или более следующих белковых комплексах: комплексе GARP-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP3-TGF $\beta$ 1 и комплексе LRRC33-TGF $\beta$ 1; и причем антитело не связывает свободный зрелый фактор роста TGF $\beta$ 1, который не ассоциирован с про/латентным комплексом. Согласно некоторым вариантам осуществления TGF $\beta$ 1 представляет собой про-TGF $\beta$ 1 и/или латентный TGF $\beta$ 1 (например, про/латентный TGF $\beta$ 1). Согласно некоторым вариантам осуществления TGF $\beta$ 1 представляет собой латентный TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления TGF $\beta$ 1 представляет собой про-TGF $\beta$ 1.

Специфичные к изоформе ингибиторы TGF $\beta$ 1 согласно настоящему изобретению не связываются с

TGFβ2. Специфичные к изоформе ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению не связываются с TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы не связываются с про/латентным TGFβ2. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы не связываются с про/латентным TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть не препятствуют способности TGFβ1 связываться с интегрином.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 87, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 90. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 86, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 89. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 85, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 88.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит полипептидную последовательность тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 99. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит полипептидную последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 100. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит полипептидную последовательность тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO 99, и полипептидной последовательности легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 100. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело содержит CDR, представленную в SEQ ID NO: 85-90. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело состоит из двух полипептидов SEQ ID NO: 99 и двух полипептидов SEQ ID NO: 100.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по отношению к аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 95, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по отношению к аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 97.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 95, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть ингибирует активацию TGFβ1, но не активацию TGFβ2 или активацию TGFβ3.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть ингибирует высвобождение зрелого TGFβ1 из комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и/или комплекса LRRC33-TGFβ1.

Согласно одному аспекту в настоящем документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая описанное в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающую часть и фармацевтически приемлемый носитель. Такие фармацевтические композиции, как правило, являются стерильными и подходят для введения субъектам-людям. Согласно некоторым вариантам осуществления такие фармацевтические композиции могут быть представлены в виде наборов, которые охватываются настоящим изобретением.

Согласно другому аспекту в настоящем документе представлен способ ингибирования активации TGFβ1, предусматривающий воздействие на комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 или комплекс LRRC33-TGFβ1 описанным в настоящем документе антителом, его антигенсвязывающей частью или фармацевтической композицией.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть ингибирует высвобождение зрелого TGFβ1 из комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 или комплекса LRRC33-TGFβ1.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ выполняется *in vitro*. Согласно некоторым вариантам осуществления способ выполняется *in vivo*.

Таким образом, настоящее изобретение включает в себя способ лечения заболевания, связанного с нарушением регуляции передачи сигналов TGFβ1 у субъекта-человека. Такой способ предусматривает стадию: введения нуждающемуся в этом субъекту-человеку фармацевтической композиции, представ-

ленной в настоящем документе, в количестве, эффективном для лечения заболевания, причем количество достигает статистически значимой клинической эффективности и безопасности при введении популяции пациентов, имеющей заболевание.

Согласно еще одному аспекту в настоящем документе представлен ингибитор TGF $\beta$  для применения для уменьшения нежелательных явлений у субъекта, причем ингибитор TGF $\beta$  является селективным в отношении изоформы. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGF $\beta$  представляет собой антитело, которое специфично ингибирует TGF $\beta$ 1 при широком нацеливании на множество контекстов.

Согласно некоторым вариантам осуществления клетка, экспрессирующая комплекс GARP-TGF $\beta$ 1 или комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1, представляет собой Т-клетку, фибробласт, миофибробласт, макрофаг, моноцит, дендритную клетку, антигенпрезентирующую клетку, нейтрофил, клетку-супрессор миелоидного происхождения (MDSC), лимфоцит, тучную клетку, мегакариоцит, клетку натурального киллер (NK), микроглию или клетку-предшественника любой из таких клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка, экспрессирующая комплекс GARP-TGF $\beta$ 1 или комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1, представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка, экспрессирующая комплекс GARP-TGF $\beta$ 1 или комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1, представляет собой клетку, происходящую из нервного гребня. Т-клетка может представлять собой регуляторную Т-клетку (например, иммуносупрессивную Т-клетку). Т-клетка может представлять собой CD4-положительную (CD4+) Т-клетку и/или CD8-положительную (CD8+) Т-клетку. Нейтрофил может представлять собой активированный нейтрофил. Макрофаг может представлять собой поляризованный макрофаг, включая в себя профибротические и/или опухолеассоциированные макрофаги (ТАМ), например, макрофаги подтипа М2с и подтипа М2d. Макрофаг может быть активирован одним или несколькими растворимыми факторами, такими как факторы роста, цитокины, хемокины и/или другие молекулы, которые присутствуют в микроокружении конкретного заболевания (например, ТМЕ), которые могут работать аутокринным, паракринным и/или эндокринным образом. Согласно некоторым вариантам осуществления макрофаг активируется М-CSF, таким как секретируемый солидной опухолью М-CSF. Согласно некоторым вариантам осуществления макрофаг активируется TGF $\beta$ 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления клетка, экспрессирующая комплекс GARP-TGF $\beta$ 1 или комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1, представляет собой раковую клетку, например, циркулирующие раковые клетки и опухолевые клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка, экспрессирующая комплекс GARP-TGF $\beta$ 1 или комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1, рекрутируется в участок заболевания, такой как ТМЕ (например, опухолевый инфильтрат). Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессия комплекса GARP-TGF $\beta$ 1 или комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1 индуцируется микроокружением заболевания (например, ТМЕ). Согласно некоторым вариантам осуществления солидная опухоль содержит повышенные инфильтраты лейкоцитов, например CD45+. Предполагается, что опухолеассоциированные клетки CD45+ включают в себя GARP-экспрессирующие и/или LRRC33-экспрессирующие клетки.

Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1 или комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1 связан с внеклеточным матриксом (т.е. компонентами ECM).

Согласно некоторым вариантам осуществления внеклеточный матрикс содержит фибриллин и/или фибронектин. Согласно некоторым вариантам осуществления внеклеточный матрикс содержит белок, содержащий мотив RGD. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки, которые производят и депонируют комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1 или комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1, присутствуют в солидной опухоли, такие как злокачественные клетки и стромальные клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки, которые производят и депонируют комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1 или комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1, присутствуют в фиброзной ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки, которые производят и депонируют комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1 или комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1, присутствуют в костном мозге. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки, которые производят и депонируют комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1 или комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1, представляют собой миофибробласты или миофибробластоподобные клетки, включая в себя, например, связанные с раком фибробласты (CAF).

Согласно другому аспекту в настоящем документе представлен способ снижения активации TGF $\beta$ 1 у субъекта, предусматривающий введение субъекту эффективного количества антитела, его антигенсвязывающей части или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, тем самым снижая активацию TGF $\beta$ 1 у субъекта.

Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта имеется фиброзное нарушение или он характеризуется риском его развития. Согласно некоторым вариантам осуществления фиброзное нарушение включает в себя хроническое воспаление пораженной ткани/органа. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект характеризуется наличием мышечной дистрофии. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект характеризуется наличием мышечной дистрофии Дюшенна (DMD). Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта имеется или существует риск развития фиброза печени, фиброза почек, фиброза легких (например, идиопатического фиброза легких), эндометриоза или

фиброза матки. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта имеется рак (например, солидная опухоль, рак крови и миелофиброз) или существует риск его развития. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта имеется деменция или существует риск ее развития.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект дополнительно получает дополнительную терапию. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительная терапия выбрана из группы, состоящей из ингибитора миостатина, агониста VEGF, агониста IGF1, агониста FXR, ингибитора CCR2, ингибитора CCR5, двойного ингибитора CCR2/CCR5, подобного лизилоксидазе ингибитора 2, ингибитора ASK1, ингибитора ацетил-КоА-карбоксилазы (ACC), ингибитора киназы p38, пирфенидона, нинтеданиба, ингибитора GDF11, ингибитора JAK (например, ингибитора JAK2) или любой их комбинации.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть снижает супрессорную активность регуляторных Т-клеток (Treg).

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть не вызывают токсичность для органов у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления токсичность для органов включает в себя сердечнососудистую токсичность, желудочно-кишечную токсичность, иммунотоксичность, токсичность для костей, токсичность для хряща, токсичность для репродуктивной системы или токсичность для почек.

Согласно одному аспекту в настоящем документе представлен способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение субъекту эффективного количества антитела, его антигенсвязывающей части или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, тем самым подвергая субъекта лечению рака.

Согласно другому аспекту в настоящем документе представлен способ уменьшения роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение субъекту эффективного количества антитела, его антигенсвязывающей части или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, тем самым уменьшая рост опухоли у субъекта.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающую часть вводят в сочетании с дополнительным средством или дополнительным способом лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор контрольной точки. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство выбирают из группы, состоящей из антагониста PD-1, антагониста PDL1, слитого белка PD-L1 или PDL2, антагониста CTLA4 и т.д. Такие комбинированные терапии могут преимущественно использовать более низкие дозы вводимых терапевтических средств, таким образом, избегая возможных токсичностей или осложнений, связанных с различными монотерапиями или традиционными комбинированными терапиями, в которых отсутствует степень селективности/специфичности, достигаемая настоящим изобретением.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает определение (например, исследование или подтверждение) вовлечения TGFβ1 в заболевание по сравнению с TGFβ2 и TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает следующую стадию: идентификация источника (или контекста) связанного с заболеванием TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления источник/контекст оценивают путем определения экспрессии презентующих TGF молекул, например, LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33, в клиническом образце, взятом у пациентов.

Согласно еще одному аспекту в настоящем документе представлен способ получения (например, производства, изготовления) фармацевтической композиции для ингибирования передачи сигналов TGFβ, причем способ предусматривает следующие стадии: предоставления одного или нескольких средств, которые ингибируют передачу сигналов по меньшей мере одной изоформы TGFβ; измерение активности одного или нескольких средств в отношении всех изоформ TGFβ; выбор средства, селективного в отношении TGFβ1; составление композиции в фармацевтическую композицию, содержащую специфичный к изоформе ингибитор TGFβ1 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, такое как подходящий буфер. Также представлена фармацевтическая композиция, полученная таким способом. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает стадию определения (например, измерения, анализа) зависимых от контекста ингибирующих активностей одного или нескольких средств.

Предмет настоящего раскрытия также относится к документу PCT/US2013/068613, поданному 6 ноября 2013 г.; PCT/US2014/036933, поданному 6 мая 2014 г.; и PCT/US2017/021972, поданному 10 марта 2017 г., полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 представлена схема, изображающая TGFβ1 в латентном комплексе в тканевом микроокружении.

На фиг. 2A-2C показаны множественные контексты функции TGFβ1: презентуемый GARP TGFβ1 экспрессируется на регуляторных Т-клетках, которые участвуют в иммунной регуляции (фиг. 2A); презентуемый LTBP1/3 TGFβ1 депонируется фибробластами и другими клетками в ECM (фиг. 2B) и презентуемый LRRC33 TGFβ1 экспрессируется на миелоидных клетках, включая в себя макро-

фаги (фиг. 2С).

На фиг. 3 показана платформа для экспрессии белка для получения комплекса GARP-TGF $\beta$ 1 и комплекса LTBP-TGF $\beta$ 1. Система экспрессии на основе НЕК293 использует аффинную очистку Ni-NTA и гель-фильтрацию, чтобы получить количества очищенного белка в несколько миллиграмм. Показаны схемы про-TGF $\beta$  1, LTPB1, sGARP и про-TGF $\beta$ 1 C4S дикого типа.

На фиг. 4А показано специфичное связывание Ab3 с латентным TGF $\beta$ 1. На фиг. 4В показана специфичность связывания иллюстративных моноклональных антител. На фиг. 4В показано, что Ab1 и Ab2 специфично связываются с про-TGF $\beta$ 1, как измерено с помощью ИФА, но не с про-TGF $\beta$ 2, про-TGF $\beta$ 3 или зрелым TGF $\beta$ 1. На фиг. 4С показан пример антитела, которое специфично связывается (как измерено с помощью ИФА) с комплексом LTBP1-про-TGF $\beta$ 1.

На фиг. 5 представлена панель антител предшествующего уровня техники, полученных против зрелого фактора роста TGF $\beta$ , и их соответствующие профили связывания для всех трех изоформ.

На фиг. 6А, 6В представлены профили связывания, измеренные с помощью Octet для Ab1, Ab2 и Ab3, которые являются специфичными к изоформе, пермиссивными по отношению к контексту/независимыми от контекста ингибиторами TGF $\beta$ 1.

На фиг. 7А-7Н представлены клеточные анализы ингибирования.

На фиг. 8 показано ингибирующее действие Ab3 на индуцированную калликреином активацию TGF $\beta$ 1 *in vitro*.

На фиг. 9А, 9В показаны ингибирующие эффекты Ab1 и Ab3 на зависимую от регуляторных Т-клеток супрессию пролиферации эффекторных Т-клеток.

На фиг. 10А-10С показана активация экспрессии LRRC33 на клеточной поверхности в поляризованных макрофагах.

На фиг. 11 представлены результаты на модели колита совместного переноса Т-клеток.

На фиг. 12А-12К показаны ингибирующие эффекты Ab2 на механистической модели зависимого от TGF $\beta$ 1 заболевания UUO.

На фиг. 13А-13С показаны ингибирующие эффекты Ab3 на механистической модели зависимого от TGF $\beta$ 1 заболевания UUO.

На фиг. 14 показано ингибирующие эффекты Ab3 на модели индуцированного тетрахлорметаном фиброза.

На фиг. 15 представлены ингибирующие эффекты Ab3 на трансляционной модели фиброза у мышей с синдромом Альпорта.

На фиг. 16 показаны ингибирующие эффекты Ab2 на рост опухоли при карциноме MC38.

На фиг. 17 представлены эффекты Ab3 в комбинации с антагонистом PD-1 на выживаемость в модели опухоли ЕМТ-6.

На фиг. 18А-18F представлены данные по токсикологии/переносимости, показывающие улучшенные профили безопасности Ab2 у крыс.

На фиг. 19А, 19В представлены данные по токсикологии/переносимости, показывающие улучшенные профили безопасности Ab3 у крыс.

На фиг. 20 представлены данные, показывающие *in vivo* селективность в отношении изоформ Ab3 в гомеостатических клетках BAL крысы.

На фиг. 21А-21D представлена относительная экспрессия изоформ TGF $\beta$ . На фиг. 21А показана экспрессия изоформы TGF $\beta$  в сравнении с нормальным компаратором (по типу рака). На фиг. 21В показана частота экспрессии изоформы TGF $\beta$ , по типу рака человека. На фиг. 21С показана экспрессия изоформы TGF $\beta$  в отдельных образцах опухоли, по типу рака. На фиг. 21D показана экспрессия изоформы TGF $\beta$  в модельных линиях клеток сингенного рака мыши.

На фиг. 22 показаны результаты микроскопического исследования сердца, полученные из антитела рап-TGF $\beta$  из 1-недельного исследования.

#### **Подробное описание некоторых вариантов осуществления**

У млекопитающих суперсемейство трансформирующего фактора роста-бета (TGF $\beta$ ) состоит по меньшей мере из 33 генов. Они включают в себя морфогенные белки костей (BMP), активны, факторы роста и дифференцировки (GDF) и три изоформы семейства TGF $\beta$ : TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3. Считается, что TGF $\beta$  играют ключевую роль в разнообразных процессах, таких как ингибирование пролиферации клеток, ремоделирование внеклеточного матрикса (ECM) и иммунный гомеостаз. Важность TGF $\beta$ 1 для гомеостаза Т-клеток демонстрируется наблюдением того, что мыши TGF $\beta$ 1<sup>-/-</sup> выживают только 3-4 недели, не выдерживая полиорганной недостаточности из-за массивной иммунной активации (Kulkarni, A.B., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1993. 90(2): p. 770-4; Shull, M.M., et al., Nature, 1992. 359(6397): p. 693-9). Роли TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3 менее ясны. Хотя три изоформы TGF $\beta$  имеют различные временные и пространственные профили экспрессии, они передают сигналы через одни и те же рецепторы, TGF $\beta$ RI и TGF $\beta$ RII, хотя в некоторых случаях, например, для передачи сигналов TGF $\beta$ 2, также необходимы рецепторы типа III, такие как бетагликан (Feng, X.H. and R. Derynck, Annu Rev Cell Dev Biol, 2005.

21: p. 659-93; Massague, I., *Annu Rev Biochem*, 1998. 67: p. 753-91). Индуцированная лигандом олигомеризация TGF $\beta$ RI/II запускает фосфорилирование факторов транскрипции SMAD, что приводит к транскрипции генов-мишеней, таких как *Colla1*, *Col3a1*, *ACTA2* и *SERPINE1* (Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton, *Genes Dev*, 2005. 19(23): p. 2783-810). SMAD-независимые сигнальные пути TGF $\beta$  также были описаны, например, при раке или поражениях аорты у мышей Marfan (Derynck, R. and Y.E. Zhang, *Nature*, 2003. 425(6958): p. 577-84; Holm, T.M., et al., *Science*, 2011. 332(6027): p. 358-61).

Биологическое значение пути TGF $\beta$  у людей подтверждено генетическими заболеваниями. Болезнь Камурати-Энгельмана приводит к дисплазии кости вследствие аутосомно-доминантной мутации в гене TGF $\beta$ 1, приводящей к конститутивной активации передачи сигналов TGF $\beta$ 1 (Janssens, K., et al., *J Med Genet*, 2006. 43(1): p. 1-11). Пациенты с синдромом Лойеса/Дитца несут аутосомно-доминантные мутации в компонентах сигнального пути TGF $\beta$ , которые вызывают аневризму аорты, гипертелоризм и расщепление небного язычка (Van Laer, L., H. Dietz, and B. Loeys, *Adv Exp Med Biol*, 2014. 802: p. 95-105). Поскольку нарушение регуляции пути TGF $\beta$  было вовлечено в множественные заболевания, несколько лекарственных средств, которые нацелены на путь TGF $\beta$ , были разработаны и испытаны на пациентах, но с ограниченным успехом.

Дисрегуляция передачи сигналов TGF $\beta$  была связана с широким спектром заболеваний человека. Действительно, при ряде патологических состояний такая дисрегуляция может включать в себя множество аспектов функции TGF $\beta$ . Пораженная ткань, такая как фиброзные и/или воспаленные ткани и опухоли, может создавать локальное окружение, в котором активация TGF $\beta$  может вызывать обострение или прогрессирование заболевания, которое может быть по меньшей мере частично опосредовано взаимодействиями между множеством реагирующих на TGF $\beta$  клеток, которые активируются аутокринным и/или паракринным способом вместе с рядом других цитокинов, хемокинов и факторов роста, которые играют роль в определенных условиях заболевания. Например, опухолевое микроокружение (ТМЕ) содержит множество типов клеток, экспрессирующих TGF $\beta$ 1, таких как активированные миофибробластоподобные фибробласты, стромальные клетки, инфильтрирующие макрофаги, MDSC и другие иммунные клетки, в дополнение к раковым (т.е. злокачественным) клеткам. Таким образом, ТМЕ представляет собой гетерогенную популяцию клеток, экспрессирующих и/или реагирующих на TGF $\beta$ 1, но в ассоциации с более чем одним типом презентующих молекул, например, LTBP1, LTBP3, LRRC33 и GARP, в нише.

Для эффективного ингибирования активности TGF $\beta$ 1 с дисрегуляцией или приводящей к заболеванию, включающей в себя множественные типы клеток и сигнальные "контексты", авторы настоящего изобретения стремились разработать класс средств, которые обладают способностью ингибировать множественные функции TGF $\beta$ 1, но специфичным к изоформе образом. Такие средства упоминаются в настоящем документе как "специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту" ингибиторы TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы представляют собой специфичные к изоформе, независимые от контекста ингибиторы TGF $\beta$ 1. Предполагается, что применение специфичного к изоформе, пермиссивного по отношению к контексту или независимого от контекста ингибитора TGF $\beta$ 1 может оказывать ингибирующее действие на множество режимов функции TGF $\beta$ 1 при заболевании, которое включает в себя взаимодействие различных типов клеток, которые экспрессируют и/или реагируют на передачу сигналов TGF $\beta$ 1, тем самым усиливая терапевтические эффекты путем нацеливания на множественные типы комплексов предшественников TGF $\beta$ 1. Соответственно, терапевтические мишени такого ингибитора включают в себя по меньшей мере три из следующих комплексов: i) про-TGF $\beta$ 1, презентуемый GARP; ii) про-TGF $\beta$ 1, презентуемый LRRC33; iii) про-TGF $\beta$ 1, презентуемый LTBP1, и iv) про-TGF $\beta$ 1, презентуемый LTBP3. Как правило, указанные выше комплексы (i) и (ii) присутствуют на клеточной поверхности, поскольку как GARP, так и LRRC33 представляют собой трансмембранные белки, способные презентовать TGF $\beta$ 1 на внеклеточной поверхности, тогда как комплексы (iii) и (iv) являются компонентами внеклеточного матрикса. Ряд исследований пролил свет на механизмы активации TGF $\beta$ 1. Было показано, что три интегрин,  $\alpha$ V $\beta$ 6,  $\alpha$ V $\beta$ 8 и  $\alpha$ V $\beta$ 1, являются ключевыми активаторами латентного TGF $\beta$ 1 (Reed, N.I., et al., *Sci Transl Med*, 2015. 7(288): p. 288ra79; Travis, M.A. and D. Sheppard, *Annu Rev Immunol*, 2014. 32: p. 51-82; Munger, J.S., et al., *Cell*, 1999. 96(3): p. 319-28). Интегрины  $\alpha$ V связывают последовательность RGD, присутствующую в LAP TGF $\beta$ 1 и TGF $\beta$ 1, с высокой аффинностью (Dong, X., et al., *Nat Struct Mol Biol*, 2014. 21(12): p. 1091-6). Трансгенные мыши с мутацией в сайте RGD TGF $\beta$ 1, которая предотвращает связывание интегрин, но не секрецию, фенотипируют мышью TGF $\beta$ 1<sup>-/-</sup> (Yang, Z., et al., *J Cell Biol*, 2007. 176(6): p. 787-93). Мыши, у которых отсутствуют интегрины  $\beta$ 6 и  $\beta$ 8, повторяют все существенные фенотипы мышей, нокаутированных по TGF $\beta$ 1 и TGF $\beta$ 3, включая в себя полиорганное воспаление и расщелину неба, подтверждая важную роль этих двух интегринов в активации TGF $\beta$ 1 в развитии и гомеостазе (Aluwihare, P., et al., *J Cell Sci*, 2009. 122(Pt 2): p. 227-32). Ключом к зависимой от интегрин активации латентного TGF $\beta$ 1 является ковалентная связь с презентующими молекулами; разрушение дисульфидных связей между GARP и TGF $\beta$ 1 LAP путем мутагенеза не нарушает комплексообразование, но полностью устраняет активацию

TGF $\beta$ 1 посредством  $\alpha$ V $\beta$ 6 (Wang, R., et al., *Mol Biol Cell*, 2012. 23(6): p. 1129-39). Недавняя структура латентного TGF $\beta$ 1 показывает, как интегрин обеспечивает высвобождение активного TGF $\beta$ 1 из латентного комплекса: ковалентная связь латентного TGF $\beta$ 1 с его презентирующей молекулой привязывает латентный TGF $\beta$ 1 либо к ECM через LTBP, либо к цитоскелету через GARP или LRRC33. Связывание интегрин с последовательностью RGD приводит к зависимому от силы изменению структуры LAP, что позволяет высвобождать активный TGF $\beta$ 1 и связывать близлежащие рецепторы (Shi, M., et al., *Nature*, 2011. 474(7351): p. 343-9). Важность интегрин-зависимой активации TGF $\beta$ 1 при заболевании также хорошо подтверждена. Небольшой молекулярный ингибитор  $\alpha$ V $\beta$ 1 защищает от индуцированного блеомицином фиброза легких и индуцированного тетрахлоридом углерода фиброза печени (Reed, N.I., et al., *Sci Transl Med*, 2015. 7(288): p. 288ra79), и блокада  $\alpha$ V $\beta$ 6 с помощью антитела или потеря экспрессии интегрин  $\beta$ 6 супрессирует индуцированный блеомицином фиброз легких и индуцированный радиацией фиброз (Munger, J.S., et al., *Cell*, 1999. 96(3): p. 319-28); Hogan, G.S., et al., *Am J Respir Crit Care Med*, 2008. 177(1): p. 56-65). Помимо интегрин были задействованы другие механизмы активации TGF $\beta$ 1, включая в себя тромбоспондин-1 и активацию протеазами, такими как матриксные металлопротеиназы (MMP), катепсин D или калликреин. Однако большинство этих исследований было выполнено *in vitro* с использованием очищенных белков; роль этих молекул в исследованиях *in vivo* меньше доказана. Нокаут тромбоспондина-1 повторяет некоторые аспекты фенотипа TGF $\beta$ 1-/- в некоторых тканях, но не защищает при индуцированном блеомицином фиброзе легких, о котором известно, что он зависит от TGF $\beta$  (Ezzie, M.E., et al., *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. 44(4): p. 556-61). Кроме того, нокаут потенциальных протеаз не приводил к фенотипу TGF $\beta$ 1 (Worthington, J.J., J.E. Klementowicz, and M.A. Travis, *Trends Biochem Sci*, 2011. 36(1): p. 47-54). Это может быть объяснено избыточностью или критичностью этих механизмов при конкретных заболеваниях, а не развитием и гомеостазом.

Таким образом, описанные в настоящем документе специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1 включают в себя ингибиторы, которые работают путем предотвращения стадии активации TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы могут ингибировать зависимую от интегрин (например, механическую или принудительную) активацию TGF $\beta$ 1 (смотрите фиг. 2). Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы могут ингибировать зависимую от протеазы или индуцированную протеазой активацию TGF $\beta$ 1. Последний включает в себя ингибиторы, которые ингибируют стадию активации TGF $\beta$ 1 независимо от интегрин. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы могут ингибировать активацию TGF $\beta$ 1 независимо от способа активации, например, ингибировать как зависимую от интегрин активацию, так и зависимую от протеазы активацию TGF $\beta$ 1. Неограничивающие примеры протеаз, которые могут активировать TGF $\beta$ 1, включают в себя такие сериновые протеазы, как калликреины, хемотрипсин, трипсин, эластазы, плазмин, а также цинковые металлопротеазы (семейство MMP), такие как MMP-2, MMP-9 и MMP-13. Калликреины включают в себя плазменные калликреины и тканевые калликреины, такие как KLK1, KLK2, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK9, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13, KLK14 и KLK14. На фиг. 8 представлен один пример специфичного к изоформе, независимого от контекста ингибитора TGF $\beta$ 1, который может ингибировать зависимую от калликреина активацию TGF $\beta$ 1 *in vitro*. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы по настоящему изобретению предотвращают высвобождение или диссоциацию активного (зрелого) фактора роста TGF $\beta$ 1 из латентного комплекса. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы могут работать путем стабилизации неактивной (например, латентной) конформации комплекса.

TGF $\beta$  участвует в ряде биологических процессов, включая в себя фиброз, иммуномодуляцию и прогрессирование рака. TGF $\beta$ 1 был первым идентифицированным представителем суперсемейства белков TGF $\beta$ . Как и другие представители суперсемейства TGF $\beta$ , TGF $\beta$ 1 и изоформы TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3 первоначально экспрессируются в виде неактивных предшественников пробелковых форм (называемых про-TGF $\beta$ ). Белки TGF $\beta$  (например, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3) протеолитически расщепляются пропротеин-конвертазами (например, фурином) с образованием латентной формы (называемой латентным TGF $\beta$ ). Согласно некоторым вариантам осуществления пропротеиновая форма или латентная форма белка TGF $\beta$  (например, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3) может упоминаться как "про/латентный белок TGF $\beta$ ". TGF $\beta$ 1 может быть презентирован другим молекулам в комплексе с несколькими молекулами, включая в себя, например, GARP (для образования комплекса GARP-TGF $\beta$ 1), LRRC33 (для образования комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1), LTBP1 (для образования комплекса LTBP1-TGF $\beta$ 1) и/или LTBP3 (для образования комплекса LTBP3-TGF $\beta$ 1). TGF $\beta$ 1, присутствующий в этих комплексах, может быть в латентной форме (латентный TGF $\beta$ 1) или в форме предшественника (про-TGF $\beta$ 1).

Настоящее изобретение особенно применимо для терапевтического применения при определенных заболеваниях, которые связаны с множественными биологическими ролями передачи сигналов TGF $\beta$ 1, которые не ограничены одним контекстом функции TGF $\beta$ 1. В таких ситуациях может быть полезно ингибировать эффекты TGF $\beta$ 1 в разных контекстах. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществ-

ствления настоящее изобретение относится к способам нацеливания и ингибирования TGF $\beta$ 1 специфичным к изоформе образом, а не специфичным к контексту образом. Такие средства могут упоминаться как "специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту" модуляторы TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления пермиссивные по отношению к контексту модуляторы TGF $\beta$ 1 нацелены на множественные контексты (например, множественные типы комплексов про/латентного-TGF $\beta$ 1). Согласно некоторым вариантам осуществления пермиссивные по отношению к контексту модуляторы TGF $\beta$ 1 нацелены на все типы про/латентных комплексов TGF $\beta$ 1 (например, GARP-ассоциированные, LRRC33-ассоциированные, LTBP-ассоциированные и т.д.), чтобы охватить все контексты.

Несмотря на то что пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1 способны нацеливаться на более чем один тип комплексов про/латентного-TGF $\beta$  1 (т.е. с разными презентующими молекулами), согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы могут благоприятствовать одному или нескольким контекстам по сравнению с другими. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления пермиссивное по отношению к контексту антитело, которое ингибирует активацию TGF $\beta$ 1, может преимущественно ингибировать активацию TGF $\beta$ 1, опосредованную одной презентующей молекулой, над другой презентующей молекулой, даже если такое антитело способно связываться с обоими типами пролатентных комплексов. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело представляет собой моноклональное антитело, которое связывает и ингибирует активацию LTBP-ассоциированного TGF $\beta$ 1, GARP-ассоциированного TGF $\beta$ 1 и LRRC33-ассоциированного TGF $\beta$ 1, но с преимущественной ингибирующей активностью в отношении LTBP-ассоциированного TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело представляет собой моноклональное антитело, которое связывает и ингибирует активацию LTBP1-ассоциированного TGF $\beta$ 1, LTBP3-ассоциированного TGF $\beta$ 1, GARP-ассоциированного TGF $\beta$ 1 и LRRC33-ассоциированного TGF $\beta$ 1, но с преимущественной ингибирующей активностью в отношении LTBP1- и LTBP3-ассоциированного TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело представляет собой моноклональное антитело, которое связывает и ингибирует активацию LTBP1-ассоциированного TGF $\beta$ 1, LTBP3-ассоциированного TGF $\beta$ 1, GARP-ассоциированного TGF $\beta$ 1 и LRRC33-ассоциированного TGF $\beta$ 1, но с преимущественной ингибирующей активностью в отношении GARP-ассоциированного TGF $\beta$ 1 и LRRC33-ассоциированного TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело представляет собой моноклональное антитело, которое связывает и ингибирует активацию GARP-ассоциированного TGF $\beta$ 1 и LRRC33-ассоциированного TGF $\beta$ 1, но с преимущественной ингибирующей активностью в отношении LRRC33-ассоциированного TGF $\beta$ 1.

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением могут быть созданы различные степени селективности для нацеливания на подмножество эффектов TGF $\beta$ . Специфичные к изоформе ингибиторы TGF $\beta$ 1 (которые нацелены на единственную изоформу TGF $\beta$ , например, TGF $\beta$ 1) обеспечивают более высокую селективность, чем ингибиторы пан-TGF $\beta$  (которые нацелены на множественные или все изоформы TGF $\beta$ ). Специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1 (которые нацелены на множественные контексты единственной изоформы TGF $\beta$ 1) обеспечивают более высокую селективность, чем специфичные к изоформе ингибиторы. Специфичные к изоформе, независимые от контекста ингибиторы TGF $\beta$ 1 (которые нацелены и ингибируют функции TGF $\beta$ 1 независимо от того, с какой из презентующих молекул ассоциированы) обеспечивают специфичность к изоформе, в то же время обеспечивая более широкий охват ингибирующих эффектов при множественных активностях TGF $\beta$ 1.

Определения.

Для того чтобы настоящее раскрытие могло быть более понятным, сначала определяются определенные термины. Эти определения должны быть прочитаны в свете остальной части настоящего раскрытия и понятны специалисту в настоящей области техники. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, характеризуются тем же значением, которое обычно понимают специалисты в настоящей области техники. Дополнительные определения приведены в подробном описании.

Антитело. Термин "антитело" охватывает любую встречающуюся в природе рекомбинантную, модифицированную или сконструированную иммуноглобулиновую или иммуноглобулиноподобную структуру или антигенсвязывающий фрагмент или его часть, или их производное, как дополнительно описано в другом месте настоящего документа. Таким образом, термин относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфично связывается с антигеном-мишенью, и включает в себя, например, химерные, гуманизированные, полностью человеческие и биспецифические антитела. Интактное антитело, как правило, будет включать в себя по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие

цепи, но в некоторых случаях может включать в себя меньшее количество цепей, таких как антитела, встречающиеся в природе у верблюдов, которые могут содержать только тяжелые цепи. Антитела могут происходить исключительно из одного источника или могут быть "химерными", т.е. разные части антитела могут происходить из двух разных антител. Антитела или их антигенсвязывающие части могут быть получены в гибридомах способами рекомбинантной ДНК или посредством ферментативного или химического расщепления интактных антител. Используемый в настоящем документе термин "антитела" включает в себя моноклональные антитела, биспецифические антитела, миниантитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в настоящем документе "миметиками антител"), химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слияния антител (иногда называемые в настоящем документе как "конъюгаты антител"), соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления этот термин также охватывает пептидные антитела.

Антиген. Термин "антиген" относится к молекулярной структуре, которая обеспечивает эпитоп, например, молекулу или часть молекулы или комплекса молекул или частей молекул, способных связываться с помощью селективного связывающего средства, такого как антигенсвязывающий белок (включая в себя, например, антитело). Таким образом, селективное связывающее средство может специфично связываться с антигеном, который образован двумя или более компонентами в комплексе. Согласно некоторым вариантам осуществления антиген может использоваться у животного для получения антител, способных связываться с этим антигеном. Антиген может обладать одним или несколькими эпитопами, которые способны взаимодействовать с различными антигенсвязывающими белками, например, антителами. Антигенсвязывающая часть/фрагмент: Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном (например, TGF $\beta$ 1). Антигенсвязывающие части включают в себя, без ограничения, любой встречающийся в природе, ферментативно полученный, синтетический или полученный с помощью генной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфично связывается с антигеном с образованием комплекса. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающая часть антитела может быть получена, например, из молекул целого антитела, используя любые подходящие стандартные способы, такие как протеолитическое расщепление или способы рекомбинантной генной инженерии, предусматривающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей вариabельные и необязательно константные домены антитела. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих частей включают в себя: (i) фрагменты Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагменты F(ab')<sub>2</sub>, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагменты Fd, состоящие из доменов VH и CH1; (iv) фрагменты Fv, состоящие из доменов VL и VH одного плеча антитела; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv) (Bird et al. (1988) SCIENCE 242:423-426 и Huston et al. (1988) PROC. NAT'L. ACAD. SCI. USA 85:5879-5883); (vi) фрагменты dAb (смотрите, например, Ward et al. (1989) NATURE 341: 544-546) и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR)). Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также включены. Термин антигенсвязывающая часть антитела включает в себя "одноцепочечный фрагмент Fab", иначе известный как "scFab", содержащий вариabельный домен тяжелой цепи антитела (VH), константный домен 1 антитела (CH1), вариabельный домен легкой цепи антитела (VL), константный домен легкой цепи антитела (CL) и линкер, причем указанные домены антитела и указанный линкер имеют один из следующих порядков в направлении от N-конца к C-концу: а) VH-CH1-линкер-VL-CL, б) VL-CL-линкер-VH-CH1, в) VH-CL-линкер-VL-CH1 или д) VL-CH1-линкер-VH-CL; и причем указанный линкер представляет собой полипептид по меньшей мере из 30 аминокислот, предпочтительно от 32 до 50 аминокислот.

Рак. Используемый в настоящем документе термин "рак" относится к физиологическому состоянию многоклеточных эукариот, которое обычно характеризуется нерегулируемой пролиферацией клеток и злокачественным новообразованием. Таким образом, этот термин в широком смысле охватывает солидные опухоли, рак крови (например, лейкозы), а также миелофиброз и множественную миелому.

Клеточно-ассоциированный TGF $\beta$ 1: Термин относится к TGF $\beta$ 1 или его сигнальному комплексу (например, про/латентному TGF $\beta$ 1), который связан с мембраной (например, привязан к поверхности клетки). Как правило, такая клетка представляет собой иммунную клетку. Презентируемый GARP или LRRC33 TGF $\beta$ 1 представляет собой ассоциированный с клеткой TGF $\beta$ 1.

Ингибитор контрольной точки. В контексте настоящего раскрытия ингибиторы контрольной точки относятся к ингибиторам иммунной контрольной точки и характеризуются понятным в настоящей области техники значением. Как правило, мишень представляет собой молекулу рецептора на Т-клетках или НК-клетках или соответствующий лиганд клеточной поверхности на антигенпрезентирующих клетках (APC) или опухолевых клетках. Иммунные контрольные точки активируются в иммунных клетках, чтобы предотвратить развитие воспалительного иммунитета против "себя". Следовательно, изменение баланса иммунной системы с помощью ингибирования контрольной точки должно позволить ее полно-

стью активировать для выявления и устранения рака. Наиболее известными ингибиторными рецепторами, участвующими в контроле иммунного ответа, являются цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген-4 (CTLA-4), белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1), домен Т-клеточного иммуноглобулина и домен муцина 3 (TIM3), ген 3 активации лимфоцитов (LAG3), киллерный иммуноглобулиноподобный рецептор (KIR), индуцированный глюкокортикоидом рецептор фактора некроза опухоли (GITR) и содержащий V-домен иммуноглобулина (Ig) супрессор активации Т-клеток (VISTA). Неограничивающие примеры ингибиторов контрольной точки включают в себя: ниволумаб, пембролизумаб, BMS-936559, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, ипилимумаб, тремелимуаб, IMP-321, BMS-986016 и лирилумаб.

Клиническое преимущество. Используемый в настоящем документе термин "клиническое преимущество" подразумевает как эффективность, так и безопасность терапии. Таким образом, терапевтическое лечение, которое обеспечивает желаемое клиническое преимущество, является одновременно эффективным и безопасным (например, с переносимыми или приемлемыми токсическими эффектами или нежелательными явлениями).

Комбинированная терапия: "Комбинированная терапия" относится к схемам лечения по клиническим показаниям, которые содержат два или более терапевтических средства. Таким образом, термин относится к терапевтической схеме лечения, в которой первая терапия, содержащая первую композицию (например, активный ингредиент), вводится в сочетании со второй терапией, содержащей вторую композицию (активный ингредиент), пациенту, которому предназначено лечение того же самого или перекрывающегося заболевания или клинического состояния. Первая и вторая композиции могут действовать как на одну клеточную мишень, так и на отдельные клеточные мишени. Фраза "в сочетании с" в контексте комбинированной терапии означает, что терапевтические эффекты первой терапии перекрываются во времени и/или в пространстве с терапевтическими эффектами второй терапии у субъекта, получающего комбинированную терапию. Таким образом, комбинированная терапия может быть составлена в виде единого состава для одновременного введения или в виде отдельных составов для последовательного введения терапий.

Комбинационный или комбинаторный эпитоп. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующие антитела по настоящему изобретению могут связывать эпитоп, образованный двумя или более компонентами (например, частями или сегментами) про/латентного комплекса TGFβ1. Такой эпитоп упоминается как комбинационный или комбинаторный эпитоп. Таким образом, комбинационный эпитоп может содержать аминокислотный остаток(и) из первого компонента комплекса и аминокислотный остаток(и) из второго компонента комплекса и так далее. Каждый компонент может состоять из одного белка или из двух или более белков антигенного комплекса. Связывание антитела с комбинационным эпитопом зависит не только от первичной аминокислотной последовательности антигена. Скорее, комбинационный эпитоп образуется со структурными вкладами из двух или более компонентов (например, частей или сегментов, таких как аминокислотные остатки) антигена или антигенного комплекса.

Конкурировать или перекрестно конкурировать: Термин "конкурировать", когда он используется в контексте антигенсвязывающих белков (например, антитела или его антигенсвязывающей части), которые конкурируют за один и тот же эпитоп, означает конкуренцию между антигенсвязывающими белками, как определено посредством анализа, в котором исследуемый антигенсвязывающий белок предотвращает или ингибирует (например, уменьшает) специфичное связывание эталонного антигенсвязывающего белка с общим антигеном (например, TGFβ1 или его фрагментом). Для определения того, конкурирует ли один антигенсвязывающий белок с другим, можно использовать множество типов анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), сэндвич-конкурентный анализ; твердофазный прямой биотин-авидин EIA; твердофазный анализ прямого мечения и твердофазный сэндвич-анализ прямого мечения. Как правило, когда конкурирующий антигенсвязывающий белок присутствует в избытке, он будет ингибировать (например, уменьшать) специфичное связывание эталонного антигенсвязывающего белка с общим антигеном по меньшей мере на 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или 75% или более. В некоторых случаях связывание ингибируется по меньшей мере на 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97% или 97% или более. Согласно некоторым вариантам осуществления первое антитело или его антигенсвязывающая часть и второе антитело или его антигенсвязывающая часть перекрестно блокируют друг друга по отношению к одному и тому же антигену, например, как анализировали с помощью Viasog или Octet, с использованием стандартные условия исследования, например, в соответствии с инструкциями производителя (например, связывание анализируют при комнатной температуре, ~20-25°C). Согласно некоторым вариантам осуществления первое антитело или его фрагмент и второе антитело или его фрагмент могут иметь один и тот же эпитоп. Согласно другим вариантам осуществления первое антитело или его фрагмент и второе антитело или его фрагмент могут иметь неидентичные, но перекрывающиеся эпитопы. Согласно еще другим вариантам осуществления первое антитело или его фрагмент и второе антитело или его фрагмент могут иметь отдельные (разные) эпитопы, которые находятся в непосредственной близости в трехмерном пространстве, так что связывание антитела перекрестно блокируется посредством стерического препятствия. "Перекрестное блокиро-

вание" означает, что связывание первого антитела с антигеном предотвращает связывание второго антитела с тем же антигеном, и, аналогично, связывание второго антитела с антигеном предотвращает связывание первого антитела с тем же антигеном.

Определяющая комплементарность область. Используемый в настоящем документе термин "CDR" относится к определяющей комплементарности области в переменных последовательностях антител. В каждой из переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи имеется три CDR, которые обозначены как CDR1, CDR2 и CDR3 для каждой из переменных областей. Используемый в настоящем документе термин "набор CDR" относится к группе из трех CDR, которые встречаются в одной переменной области, которая может связывать антиген. Точные границы этих CDR были определены по-разному в зависимости от разных систем. Система, описанная Kabat (Kabat et al. (1987; 1991) "Последовательности белков, представляющих иммунологический интерес" (National Institutes of Health, Bethesda, Md.), не только обеспечивает однозначную систему нумерации остатков, применимую к любой переменной области антитела, но и также обеспечивает точные границы остатков, определяющие три CDR. Эти CDR могут упоминаться как CDR Kabat. Chothia и сотрудники (Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917 и Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883) обнаружили, что некоторые подчасти в CDR Kabat принимают почти идентичные конформации пептидного остова, несмотря на большое разнообразие на уровне аминокислотной последовательности. Эти подчасти были обозначены как L1, L2 и L3 или H1, H2 и H3, где "L" и "H" обозначают области легкой цепи и тяжелой цепи, соответственно. Эти области могут упоминаться как CDR Chothia, которые имеют границы, которые перекрываются с CDR Kabat. Другие границы, определяющие перекрытие CDR с CDR Kabat были описаны Padlan (1995), FASEB J. 9: 133-139 и MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5): 732-45. Тем не менее, другие определения границ CDR могут не строго следовать одной из систем, описанных в настоящем документе, но, тем не менее, будут перекрываться с CDR Kabat, хотя они могут быть сокращены или удлинены в свете прогноза или экспериментальных результатов, что конкретные остатки или группы остатков или даже целые CDR не оказывают существенного влияния на связывание антигена. Используемые в настоящем документе способы могут использовать CDR, определенные в соответствии с любой из этих систем, хотя согласно некоторым вариантам осуществления используются CDR, определенные Kabat или Chothia.

Конформационный эпитоп. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующие антитела по настоящему изобретению могут связывать эпитоп, который является специфичным к конформации. Такой эпитоп упоминается как конформационный эпитоп, специфичный к конформации эпитоп, зависимый от конформации эпитоп или чувствительный к конформации эпитоп. Соответствующее антитело или его фрагмент, который специфично связывает такой эпитоп, может упоминаться как специфичное к конформации антитело, конформационно-селективное антитело или зависимое от конформации антитело. Связывание антигена с конформационным эпитопом зависит от трехмерной структуры (конформации) антигена или антигенного комплекса.

Константная область. Константный домен иммуноглобулина относится к константному домену тяжелой или легкой цепи. Аминокислотные последовательности константного домена тяжелой цепи и легкой цепи человеческого IgG известны в настоящей области техники.

Пермиссивные по отношению к контексту; независимые от контекста: "Пермиссивные по отношению к контексту" и "независимые от контекста" ингибиторы TGF $\beta$  являются ингибиторами широкого контекста, которые могут воздействовать более чем на один режим функции TGF $\beta$ . "Пермиссивный по отношению к контексту ингибитор" TGF $\beta$  представляет собой средство, способное ингибировать множество контекстов функции TGF $\beta$ , например, активности TGF $\beta$ , ассоциированные по меньшей мере с двумя из следующих: GARP (также называемым LRRC32), LRRC33, LTBP1 и LTBP3. Среди пермиссивных по отношению к контексту ингибиторов, где средство способно ингибировать активности TGF $\beta$  независимо от специфичных презентующих молекул, такой ингибитор называют "независимым от контекста" ингибитором. Таким образом, независимый от контекста ингибитор TGF $\beta$  может ингибировать активности TGF $\beta$ , связанные со всеми из следующих факторов: GARP, LRRC33, LTBP1 и LTBP3. Согласно некоторым вариантам осуществления пермиссивные по отношению к контексту и независимые от контекста ингибиторы могут проявлять предпочтительную или смещенную ингибирующую активность в отношении одного или нескольких контекстов по сравнению с другими.

ЕСМ-ассоциированный TGF $\beta$ 1. Термин относится к TGF $\beta$ 1 или его сигнальному комплексу (например, про/латентному TGF $\beta$ 1), который является компонентом (например, депонированным в) внеклеточного матрикса. TGF $\beta$ 1, который презентуется LTBP1 или LTBP3, представляет собой ЕСМ-ассоциированный TGF $\beta$ 1.

Эффективное количество. "Эффективное количество" (или терапевтически эффективное количество) представляет собой дозировку или схему дозирования, которая обеспечивает статистически значимые клинические преимущества в популяции пациентов.

Эпитоп. Термин "эпитоп" включает в себя любую молекулярную детерминанту (например, полипептидную детерминанту), которая может специфично связываться со связывающим средством, иммуноглобулином или рецептором Т-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления детерминанты

эпитопов включают в себя химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахара, фосфорил или сульфонил, и согласно некоторым вариантам осуществления могут иметь конкретные трехмерные структурные характеристики и/или конкретные характеристики заряда. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связана связывающим белком. Таким образом, эпитоп состоит из аминокислотных остатков участка антигена (или его фрагмента), о котором известно, что он связывается с комплементарным сайтом специфичного партнера по связыванию. Антигенный фрагмент может содержать более одного эпитопа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело специфично связывается с антигеном, когда оно распознает антиген-мишень в сложной смеси белков и/или макромолекул. Например, считается, что антитела "связываются с одним и тем же эпитопом", если антитела перекрестно конкурируют (одно предотвращает связывающий или модулирующий эффект другого). Кроме того, структурные определения эпитопов (перекрывающиеся, сходные, идентичные) являются информативными, но функциональные определения часто более актуальны, поскольку они охватывают структурные (связывание) и функциональные (модуляция, конкуренция) параметры.

Фиброз. Термин "фиброз" или "фиброзное состояние/нарушение" относится к процессу или проявлению, характеризующемуся патологическим накоплением компонентов внеклеточного матрикса (ECM), таких как коллагены, в ткани или органе.

Комплекс GARP-TGFβ1. Используемый в настоящем документе термин "комплекс GARP-TGFβ1" относится к белковому комплексу, содержащему пробелковую форму или латентную форму белка трансформирующего фактора роста-β1 (TGFβ1) и повторный преобладающий белок гликопротеина-A (GARP) или его фрагмент или вариант. Согласно некоторым вариантам осуществления пробелковая форма или латентная форма белка TGFβ1 может упоминаться как "про/латентный белок TGFβ1". Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс GARP-TGFβ1 содержит GARP, ковалентно связанный с про/латентным TGFβ1 через одну или несколько дисульфидных связей. Согласно другим вариантам осуществления комплекс GARP-TGFβ1 содержит GARP, нековалентно связанный с про/латентным TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс GARP-TGFβ1 представляет собой встречающийся в природе комплекс, например, комплекс GARP-TGFβ1 в клетке. Иллюстративный комплекс GARP-TGFβ1 показан на фиг. 3.

Антитело человека. Используемый в настоящем документе термин "антитело человека" включает в себя антитела, содержащие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека по настоящему раскрытию могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфичного мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако используемый в настоящем документе термин "человеческое антитело" не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека.

Гуманизованное антитело. Термин "гуманизованное антитело" относится к антителам, которые содержат последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи из отличного от человеческого вида (например, мыши), но в которых по меньшей мере часть последовательности VH и/или VL была изменена, чтобы быть более "подобной человеческой", т.е. более похожей на переменные последовательности зародышевой линии человека. Одним из типов гуманизованных антител является CDR-привитое антитело, в котором последовательности CDR человека вводят в отличные от человеческих последовательности VH и VL для замены соответствующих отличных от человеческих последовательностей CDR. Также "гуманизованное антитело" представляет собой антитело или его вариант, производное, аналог или фрагмент, которое иммуноспецифично связывается с представляющим интерес антигеном и которое содержит область FR, имеющую по существу аминокислотную последовательность человеческого антитела, и область CDR, имеющую по существу аминокислотную последовательность отличного от человеческого антитела. Используемый в настоящем документе термин "по существу" в контексте CDR относится к CDR, содержащей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности CDR антитела, не представляющего собой антитело человека. Гуманизованное антитело содержит практически все по меньшей мере из одного и, как правило, двух переменных доменов (Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, FabC, Fv), в которых все или по существу все области CDR соответствуют таковым отличного от человеческого иммуноглобулина (т.е. донорского антитела) и все или по существу все области FR являются таковыми консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления гуманизованное антитело также содержит по меньшей мере часть области Fc иммуноглобулина, как правило, таковой человеческого иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам осуществления гуманизованное антитело содержит легкую цепь, а также по меньшей мере переменный домен тяжелой цепи. Антитело также может включать в себя области CH1, шарнир, CH2, CH3 и CH4 тяжелой цепи. Со-

гласно некоторым вариантам осуществления гуманизованное антитело содержит только гуманизованную легкую цепь. Согласно некоторым вариантам осуществления гуманизованное антитело содержит только гуманизованную тяжелую цепь. Согласно конкретным вариантам осуществления гуманизованное антитело содержит только гуманизованный переменный домен легкой цепи и/или гуманизованной тяжелой цепи.

Специфичный к изоформе. Термин "специфичность к изоформе" относится к способности средства отличать одну изоформу от других структурно связанных изоформ (т.е. селективность). Специфичный к изоформе ингибитор TGF $\beta$  проявляет свою ингибирующую активность в отношении одной изоформы TGF $\beta$ , но не других изоформ TGF $\beta$  в данной концентрации. Например, специфичное к изоформе TGF $\beta$ 1 антитело избирательно связывает TGF $\beta$ 1. Специфичный к TGF $\beta$ 1 ингибитор (антитело) предпочтительно нацелен (связывается, тем самым, ингибирует) на изоформу TGF $\beta$ 1 по сравнению с TGF $\beta$ 2 или TGF $\beta$ 3 со значительно большей аффинностью. Например, селективность в этом контексте может относиться по меньшей мере к 500-1000-кратному различию в соответствующих значениях аффинности, измеренных анализом связывания *in vitro*, таким как Octet и Biacore. Согласно некоторым вариантам осуществления селективность такова, что ингибитор при использовании в дозировке, эффективной для ингибирования TGF $\beta$ 1 *in vivo*, не ингибирует TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3. Например, антитело может предпочтительно связываться с TGF $\beta$ 1 при аффинности  $\sim$ 1 пМ, тогда как то же самое антитело может связываться с TGF $\beta$ 2 и/или TGF $\beta$ 3 при  $\sim$ 0,5-50 нМ. Для того чтобы такой ингибитор был применим в качестве терапевтического средства, дозировка для достижения желаемых эффектов (например, терапевтически эффективные количества) должна находиться в пределах окна, в пределах которого ингибитор может эффективно ингибировать изоформу TGF $\beta$ 1 без ингибирования TGF $\beta$ 2 или TGF $\beta$ 3.

Выделенный. Используемый в настоящем документе термин "выделенное" антитело относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, характеризующихся различными антигенными специфичностями. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное антитело по существу не содержит другого нежелательного клеточного материала и/или химических веществ.

Локализованный: В контексте настоящего раскрытия термин "локализованный" (как в "локализованной опухоли") относится к анатомически выделенным или выделяемым нарушениям, таким как солидные злокачественные новообразования, в отличие от системного заболевания. Например, определенный лейкоз может иметь как локализованный компонент (например, костный мозг), так и системный компонент (например, циркулирующие клетки крови) в заболевании.

Комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1. Используемый в настоящем документе термин "комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1" относится к комплексу между пробелковой формой или латентной формой белка трансформирующего фактора роста- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) и содержащим богатый лейцином повтор белком 33 (LRRC33; также известный как отрицательный регулятор активных форм кислорода или NRROS) или его фрагментом или вариантом. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1 содержит LRRC33, ковалентно связанный с про/латентным TGF $\beta$ 1 через одну или несколько дисульфидных связей. Согласно другим вариантам осуществления комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1 содержит LRRC33, нековалентно связанный с про/латентным TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1 представляет собой встречающийся в природе комплекс, например, комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1 в клетке.

Комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1. Используемый в настоящем документе термин "комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1" относится к белковому комплексу, содержащему пробелковую форму или латентную форму белка трансформирующего фактора роста- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) и латентный TGF-бета связывающий белок 1 (LTBP1) или его фрагмент или вариант. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1 содержит LTBP1, ковалентно связанный с про/латентным TGF $\beta$ 1 через одну или несколько дисульфидных связей. Согласно другим вариантам осуществления комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1 содержит LTBP1, нековалентно связанный с про/латентным TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1 представляет собой встречающийся в природе комплекс, например, комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1 в клетке. Иллюстративный комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1 показан на фиг. 3.

Комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1. Используемый в настоящем документе термин "комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1" относится к белковому комплексу, содержащему пробелковую форму или латентную форму белка трансформирующего фактора роста- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) и латентный TGF-бета связывающий белок 3 (LTBP3) или его фрагмент или вариант. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1 содержит LTBP3, ковалентно связанный с про/латентным TGF $\beta$ 1 через одну или несколько дисульфидных связей. Согласно другим вариантам осуществления комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1 содержит LTBP1, нековалентно связанный с про/латентным TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1 представляет собой встречающийся в природе комплекс, например, комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1 в клетке. Иллюстративный комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1 показан на фиг. 3.

Миелофиброз. "Миелофиброз", также известный как остеомиелофиброз, представляет собой отно-

нительно редкое пролиферативное нарушение костного мозга (например, рак), которое относится к группе заболеваний, называемых миелопролиферативными нарушениями. Миелофиброз классифицируется на филадельфийскую хромосомно-негативную (-) ветвь миелопролиферативных новообразований. Миелофиброз характеризуется пролиферацией аномального клона гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге и других местах, что приводит к фиброзу или замене костного мозга рубцовой тканью. Термин миелофиброз, если не указано иное, относится к первичному миелофиброзу (PMF). Он может также упоминаться как хронический идиопатический миелофиброз (сIMF) (термины идиопатический и первичный означают, что в этих случаях заболевание неизвестного или спонтанного происхождения). Это контрастирует с миелофиброзом, который развивается вторично по отношению к полицитемии или эссенциальной тромбоцитемии. Миелофиброз представляет собой форму миелоидной метаплазии, которая относится к изменению типа клеток в кроветворной ткани костного мозга, и часто эти два термина используются как синонимы. Термины агногенная миелоидная метаплазия и миелофиброз с миелоидной метаплазией (МММ) также используются для обозначения первичного миелофиброза.

Ингибитор пан-TGF $\beta$ . Термин "ингибитор пан-TGF $\beta$ " относится к любому средству, которое способно ингибировать или быть антагонистом множественным изоформам TGF $\beta$ . Такой ингибитор может представлять собой низкомолекулярный ингибитор изоформ TGF $\beta$ . Термин включает в себя антитело пан-TGF $\beta$ , которое относится к любому средству, которое способно связываться более чем с одной изоформой TGF $\beta$ , например, по меньшей мере с двумя из TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело пан-TGF $\beta$  связывает все три изоформы, т.е. TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело пан-TGF $\beta$  связывает и нейтрализует все три изоформы, т.е. TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3.

Презентирующая молекула. Термин "презентирующая молекула" или "молекула презентации" TGF $\beta$  представляет собой белковый объект, который способен связываться с неактивной формой(ами) TGF $\beta$ , тем самым "презентируя" пробелок во внеклеточном домене. На сегодняшний день идентифицированы четыре молекулы, презентующие TGF $\beta$ : связывающий латентный TGF $\beta$  белок-1 (LTBP1) и LTBP3 откладывается во внеклеточном матриксе (т.е. компонентах ECM), в то время как преобладающий повтор гликопротеина-A (GARP/LRRC32) и содержащий богатый лейциновыми повторами белок 33 (LRRC33) содержит трансмембранный домен и презентует латентный TGF $\beta$ 1 на поверхности определенных клеток, таких как иммунные клетки. Одна изоформа TGF $\beta$ 1 участвует в ряде биологических процессов как при нормальных, так и при патологических состояниях. Они включают в себя, без ограничения, поддержание гомеостаза ткани, воспалительный ответ, реорганизацию ECM, такую как заживление ран, и регуляцию иммунных реакций, а также фиброз органов, рак и аутоиммунитет.

про-TGF $\beta$ 1. Используемый в настоящем документе термин "про-TGF $\beta$ 1" предназначен для охвата предшественников неактивного комплекса TGF $\beta$ 1, который включает в себя последовательность продомена TGF $\beta$ 1 внутри комплекса. Таким образом, термин может включать в себя как про-, так и латентные формы TGF $\beta$ 1. Выражение "про/латентный TGF $\beta$ 1" можно использовать взаимозаменяемо. Форма "про" TGF $\beta$ 1 существует до протеолитического расщепления в сайте фурина. Говорят, что после расщепления полученная форма является "латентной" формой TGF $\beta$ 1. "Латентный" комплекс остается связанным до следующего запуска активации, такого как событие активации, управляемое интегрином. Как показано на фиг. 3, комплекс про-TGF $\beta$ 1 состоит из димерных полипептидов белка TGF $\beta$ 1, связанных дисульфидными связями. Следует отметить, что прилагательное "латентный" может, в общем, использоваться для описания "неактивного" состояния TGF $\beta$ 1 перед опосредованными интегрином или другими событиями активации.

Регуляторные Т-клетки. "Регуляторные Т-клетки" или Treg характеризуются экспрессией биомаркеров CD4, FOXP3 и CD25. Treg иногда называют супрессорными Т-клетками и они представляют собой субпопуляцию Т-клеток, которые модулируют иммунную систему, поддерживают толерантность к аутоантигенам и предотвращают аутоиммунные заболевания. Treg являются иммуносупрессивными и, как правило, супрессируют или подавляют индукцию и пролиферацию эффекторных Т-клеток (Teff). Treg могут развиваться в тимусе (так называемые CD4+ Foxp3+ "натуральные" Treg) или дифференцироваться из наивных CD4+ Т-клеток на периферии, например, после воздействия TGF $\beta$  или ретиноевой кислоты.

Солидная опухоль. Термин "солидная опухоль" относится к пролиферативным нарушениям, приводящим к аномальному росту или массе ткани, которая, как правило, не содержит кист или жидких областей. Солидные опухоли могут быть доброкачественными (не раковыми) или злокачественными (раковыми). Солидные опухоли могут состоять из раковых (злокачественных) клеток, стромальных клеток, включая в себя CAF, и инфильтрирующих лейкоцитов, таких как макрофаги и лимфоциты.

Специфичное связывание. Используемый в настоящем документе термин "специфичное связывание" или "специфично связывает" означает, что взаимодействие антитела или его антигенсвязывающей части с антигеном зависит от наличия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа). Например, антитело или его антигенсвязывающая часть связывается со специфичным белком, а не с белками в целом. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязы-

вающая часть специфично связывается с мишенью, например, TGFβ1, если антитело имеет KD для мишени, составляющую по меньшей мере приблизительно  $10^{-4}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М,  $10^{-7}$  М,  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М,  $10^{-10}$  М,  $10^{-11}$  М,  $10^{-12}$  М,  $10^{-13}$  М или менее. Согласно некоторым вариантам осуществления используемый в настоящем документе термин "специфичное связывание с эпитопом TGFβ1", "специфично связывается с эпитопом TGFβ1", "специфичное связывание с TGFβ1" или "специфично связывается с TGFβ1" относится к антителу или его антигенсвязывающей части, которая связывается с TGFβ1 и имеет константу диссоциации (KD)  $1,0 \times 10^{-7}$  М или менее, что определяется поверхностным плазмонным резонансом. Согласно одному варианту осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть могут специфично связываться как с человеческими, так и отличными от человеческих (например, мышинными) ортологами TGFβ1.

Субъект. Термин "субъект" в контексте терапевтического применения относится к индивидууму, который получает клиническую помощь или вмешательство, такое как лечение, диагностика и т.д. Подходящие субъекты включают в себя позвоночных, включая в себя, без ограничения, млекопитающих (например, человека и отличных от человека млекопитающих). Когда субъект представляет собой человека, термин "пациент" может использоваться взаимозаменяемо. В клиническом контексте термин "популяция пациентов" или "субпопуляция пациентов" используется для обозначения группы лиц, которые подпадают под набор критериев, таких как клинические критерии (например, проявления заболевания, стадии заболевания, восприимчивость к определенным состояниям, отзывчивость на терапию и т.д.), история болезни, состояние здоровья, пол, возрастная группа, генетические критерии (например, носитель определенной мутации, полиморфизм, дубликации генов, повторы последовательности ДНК и т.д.) и факторы образа жизни (например, курение, потребление алкоголя, физические упражнения и т.д.).

TGFβ1-ассоциированное нарушение. "TGFβ1-ассоциированное нарушение" означает любое заболевание или нарушение, при котором по меньшей мере часть патогенеза и/или прогрессирования обусловлена передачей сигналов TGFβ1 или их дисрегуляцией.

Ингибитор TGFβ. Термин "ингибитор TGFβ" относится к любому средству, способному противодействовать биологической активности или функции фактора роста TGFβ (например, TGFβ1, TGFβ2 и/или TGFβ3). Термин не предназначен для ограничения его механизма действия и включает в себя, например, нейтрализующие ингибиторы, антагонисты рецепторов, ловушки растворимых лигандов и ингибиторы активации TGFβ.

"Семейство TGFβ" представляет собой класс внутри суперсемейства TGFβ и содержит три изоформы: TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3, которые являются структурно сходными.

Токсичность. Используемый в настоящем документе термин "токсичность" или "токсичности" относится к нежелательным эффектам *in vivo* у пациентов, связанным с терапией, назначаемой пациентам, таким как нежелательные побочные эффекты и нежелательные явления. "Переносимость" относится к уровню токсичности, связанной с терапией или режимом лечения, который пациент может разумно переносить без прекращения терапии из-за токсичности.

Лечить/лечение. Термин "лечить" или "лечение" включает в себя терапевтическое лечение, профилактическое лечение и применения, при которых снижается риск развития у субъекта нарушения или другого фактора риска. Таким образом, этот термин предназначен в широком смысле: вызывать терапевтическое преимущество у пациента, например, путем повышения или усиления иммунитета организма; уменьшения или изменения иммуносупрессии; уменьшения, удаления или уничтожения причиняющих вред клеток или веществ из организма; снижение бремени заболеваний (например, опухолевого бремени); предотвращение рецидива или возврата заболевания; продление рефрактерного периода и/или иное улучшение выживаемости. Термин включает в себя терапевтическое лечение, профилактическое лечение и применения, в которых снижается риск развития у субъекта нарушения или другого фактора риска. Лечение не требует полного излечения нарушения и охватывает варианты осуществления, в которых можно уменьшить симптомы или лежащие в основе факторы риска. В контексте комбинированной терапии этот термин может также относиться к: i) способности второго терапевтического средства уменьшать эффективную дозировку первого терапевтического средства для уменьшения побочных эффектов и повышения переносимости; ii) способность второй терапии делать пациента более восприимчивым к первой терапии и/или iii) способности вызывать дополнительные или синергетические клинические преимущества.

Опухолеассоциированные макрофаги. "Опухолеассоциированные макрофаги (ТАМ)" представляют собой поляризованные/активированные макрофаги с проопухолевыми фенотипами. ТАМ могут представлять собой либо происходящие из костного мозга моноциты/макрофаги, рекрутированные в опухолевый участок, либо оседлые тканевые макрофаги, происходящие из эритромиелоидных предшественников. Дифференциация моноцитов/макрофагов в ТАМ зависит от ряда факторов, включая в себя локальные химические сигналы, такие как цитокины, хемокины, факторы роста и другие молекулы, которые действуют как лиганды, а также межклеточные взаимодействия между присутствующими в нише моноцитами/макрофагами (опухолевое микроокружение). Как правило, моноциты/макрофаги могут быть поляризованы в так называемые подтипы "M1" или "M2", причем последний связан с более проопухолевым

фенотипом. В солидной опухоли до 50% массы опухоли может соответствовать макрофагам, которые предпочтительно являются M2-поляризованными.

Опухолевое микроокружение. Термин "опухолевое микроокружение (ТМЕ)" относится к нише локального заболевания, в которой опухоль (например, солидная опухоль) находится *in vivo*.

Вариабельная область. термин "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к части легкой и/или тяжелой цепи антитела, как правило, включающей в себя приблизительно от 120 до 130 аминоконцевых аминокислот в тяжелой цепи и приблизительно от 100 до 110 аминоконцевых аминокислот в легкой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления вариабельные области различных антител сильно различаются по аминокислотной последовательности даже среди антител одного и того же вида. Вариабельная область антитела, как правило, определяет специфичность конкретного антитела к его мишени.

За исключением рабочих примеров или там, где указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов или условий реакции, использованные в настоящем документе, следует понимать как измененные во всех случаях термином "приблизительно". Термин "приблизительно" при использовании в связи с процентами может означать  $\pm 1\%$ .

Используемое в настоящем документе в описании и формуле изобретения единственное число, если явно не указано иное, следует понимать как означающие "по меньшей мере один".

Фраза "и/или", используемая в настоящем документе в описании и в формуле изобретения, должна пониматься как означающая "один или оба" из элементов, соединенных таким образом, т.е. элементов, которые в некоторых случаях присутствуют вместе и в других случаях присутствуют отдельно. При желании могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, специально обозначенных в предложении "и/или", независимо от того, связаны они или не связаны с теми элементами, которые конкретно определены, если явно не указано иное. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, ссылка на "А и/или В" при использовании в сочетании с открытым языком, таким как "содержащий", может ссылаться, согласно одному варианту осуществления, на А без В (необязательно включая в себя элементы, отличные от В); согласно другому варианту осуществления на В без А (необязательно включая в себя элементы, отличные от А); согласно еще одному варианту осуществления на А и В (необязательно включая в себя другие элементы); и т.п.

Используемый в настоящем документе в описании и формуле изобретения термин "по меньшей мере один" в отношении перечня из одного или нескольких элементов следует понимать как означающий по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или нескольких элементов в перечне элементов, но не обязательно включает в себя по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно указанного в перечне элементов, и не исключая любые комбинации элементов в перечне элементов. Это определение также допускает, что при желании могут присутствовать элементы, отличные от элементов, конкретно определенных в списке элементов, к которым относится фраза "по меньшей мере один", независимо от того, связаны они или не связаны с теми элементами, которые конкретно определены. Таким образом, в качестве неограничивающего примера "по меньшей мере один из А и В" (или, что эквивалентно, "по меньшей мере один из А или В" или, что эквивалентно, "по меньшей мере один из А и/или В") может относиться согласно одному варианту осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему в себя более одного А, без присутствия В (и необязательно включающему в себя элементы, отличные от В); согласно другому варианту осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему в себя более одного В, без присутствия А (и необязательно включающему в себя элементы, отличные от А); согласно еще одному варианту осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему в себя более одного А и по меньшей мере одному, необязательно включающему в себя более одного В (и, необязательно, включающему в себя другие элементы) и т.п.

Использование терминов порядковых числительных, таких как "первый", "второй", "третий" и т.д., в формуле изобретения для изменения элемента формулы изобретения само по себе не означает какого-либо приоритета, первоочередности или порядка одного заявленного элемента по сравнению с другим, или временного порядка, в котором выполняются действия способа, но используются просто как метки, чтобы отличить один элемент формулы изобретения, имеющий определенное имя, от другого элемента, имеющего такое же имя (но для использования порядкового термина), чтобы различать элементы формулы изобретения.

Представленные в настоящем документе диапазоны понимаются как сокращение для всех значений в пределах диапазона. Например, под диапазоном от 1 до 50 понимается любое число, комбинация чисел или поддиапазон из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50, например, 10-20, 1-10, 30-40 и т.д.

Селективные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту/независимые от контекста антитела TGF $\beta$ 1.

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим частям, которые связываются с двумя или более из следующих комплексов, содержащих про/латентный-TGF $\beta$ 1: комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и комплексом LRRС33-TGF $\beta$ 1.

Соответственно, некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к антителам или их антигенсвязывающим частям, которые специфично связываются с эпитопом в таком комплексе TGF $\beta$ 1, причем эпитоп доступен для связывания антителом или его антигенсвязывающими частями, когда TGF $\beta$ 1 присутствует в комплексе GARP-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексе LRRC33-TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп доступен из-за конформационного изменения TGF $\beta$ 1 в комплексе с GARP, LTBP1, LTBP3 и/или LRRC33. Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп в TGF $\beta$ 1, с которым связываются антитела или их антигенсвязывающие части, не доступен, когда TGF $\beta$ 1 не находится в комплексе с GARP, LTBP1, LTBP3 и/или LRRC33. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части специфично не связываются с TGF $\beta$ 2. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части специфично не связываются с TGF $\beta$ 3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части не препятствуют связыванию TGF $\beta$ 1 с интегрином. Например, согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части не маскируют интегрин-связывающий сайт TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части ингибируют активацию TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части ингибируют высвобождение зрелого TGF $\beta$ 1 из комплекса GARP-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1.

Антитела или их антигенсвязывающие части, представленные в настоящем документе, специфично связываются с эпитопом множества (т.е. двух или более) комплексов TGF $\beta$ 1, причем эпитоп доступен для связывания антителом или его антигенсвязывающими частями, когда TGF $\beta$ 1 присутствует в комплексе GARP-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP2-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP3-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP4-TGF $\beta$ 1 и/или комплексе LRRC33-TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления TGF $\beta$ 1 содержит встречающуюся в природе аминокислотную последовательность млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления TGF $\beta$ 1 содержит встречающуюся в природе аминокислотную последовательность человека. Согласно некоторым вариантам осуществления TGF $\beta$ 1 содержит аминокислотную последовательность человека, обезьяны, крысы или мыши. Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть специфично не связываются с TGF $\beta$ 2. Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть специфично не связываются с TGF $\beta$ 3. Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть специфично не связываются с TGF $\beta$ 2 или TGF $\beta$ 3. Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть специфично связывается с TGF $\beta$ 1, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21. Аминокислотные последовательности TGF $\beta$ 2 и аминокислотная последовательность TGF $\beta$ 3 представлены в SEQ ID NO: 22 и 23, соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть специфично связываются с TGF $\beta$ 1, содержащим не встречающуюся в природе аминокислотную последовательность (иначе называемую в настоящем документе не встречающимся в природе TGF $\beta$ 1). Например, не встречающийся в природе TGF $\beta$ 1 может содержать одну или несколько рекомбинантно получаемых мутаций относительно встречающейся в природе аминокислотной последовательности TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная последовательность TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 или TGF $\beta$ 3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24-35, как показано в табл. 1. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная последовательность TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 или TGF $\beta$ 3 содержит аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 36-43, как показано в табл. 2.

## TGF 1

LSTCKTIDMELVKKRRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAG  
 ESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLL  
 SRAELRLLRLKLVQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWL  
 SRGGEIEGFRLSAHCSDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERA  
 QHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPC  
 PYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPALEPLPIVYVYVGRKPKVEQLSNMIVR  
 SCKCS (SEQ ID NO: 21)

## TGFβ2

SLSTCSTLDMQFMKRIEAIKQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEK  
 ASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVSAMEKNA  
 SNLVKAEFRVFRQLQNPKEVPEQRIELYQILKSKDLTSPTRQYIDSKVVKTRAEGEWLSE  
 DVTDAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCTFVPSNNYIIPNKSELEARFAGIDGTSTYTS  
 GDQKTIKSTRKNSGKTPHLLMLLPSYRLESQQTNRKRALDAAYCFRNVQDNCLL  
 RPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASP  
 CCVSQDLEPLTILYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS (SEQ ID NO: 22)

## TGFβ3

SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIKQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLE  
 EMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRNVSSVE  
 KNRTNLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWL  
 SFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVNEDDHG  
 RGDGLRLKKQKDHHPHLILMMIPPHRLDNPQGGQRKRALDTNYCFRNLNENCCVR  
 PLYIDFRQDLGWKWWHEPKGYANFCGSPCYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPC  
 CVPQDLEPLTILYVGRTPKVEQLSNMIVKSKCS (SEQ ID NO: 23)

## Иллюстративные аминокислотные последовательности TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3

Белок	Последовательность	SEQ ID NO
проTGFβ1	LSTCKTIDMELVKKRRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEV PPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYA KEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELRE AVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVVRQWLSRGGEIE GFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHG MNRPFLLL MATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSST EKNCVRLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGP CPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALE LPVIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	24
проTGFβ1 C4S	LSTCKTIDMELVKKRRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEV PPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYA KEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELRE AVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVVRQWLSRGGEIE GFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHG MNRPFLLL MATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSST EKNCVRLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGP CPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALE LPVIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	25
проTGFβ1 D2G	LSTCKTIDMELVKKRRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEV PPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYA KEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELRE AVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVVRQWLSRGGEIE GFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHG MNRPFLLL MATPLERAQHLQSSRHGALDTNYCFSSTE KNCCVRLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPC PYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEP LPVIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	26
проTGFβ1 C4S D2G	LSTCKTIDMELVKKRRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEV PPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYA KEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELRE AVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVVRQWLSRGGEIE GFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHG MNRPFLLL MATPLERAQHLQSSRHGALDTNYCFSSTE KNCCVRLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPC PYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEP LPVIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	27
проTGFβ2	SLSTCSTLDMQFMKRRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYP EPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEE YYAKEVYKIDMPPFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVSA MEKNASNLVKAEFRVFRQLQNP KARVPEQRIEL YQILK SKDLTSPTRQYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDVHVE	28

	WLHHKDRNLGFKISLHPCCTFVPSNNYIIPNKSEELE ARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLM LLPSYRLESQQTNRKRALDAAYCFRNVQDNCCLR PLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSS DTQHSRVLSTYNTINPEASAPCCVSDLEPLTILYYIG KTPKIEQLSNMIVKSCCKCS	
npoTGFβ2 C5S	SLSTSSTLDMQDMRKRIRGQILSKLKLTSPPEDYP EPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEE YYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVSA MEKNASNLVKAEFRVRLQNPKEARVPEQRIEL YQILK SKDLTSPQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDVHE WLHHKDRNLGFKISLHPCCTFVPSNNYIIPNKSEELE ARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLM LLPSYRLESQQTNRKRALDAAYCFRNVQDNCCLR PLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSS DTQHSRVLSTYNTINPEASAPCCVSDLEPLTILYYIG KTPKIEQLSNMIVKSCCKCS	29
npoTGFβ2 C5S D2G	SLSTSSTLDMQDMRKRIRGQILSKLKLTSPPEDYP EPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEE YYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVSA MEKNASNLVKAEFRVRLQNPKEARVPEQRIEL YQILK SKDLTSPQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDVHE WLHHKDRNLGFKISLHPCCTFVPSNNYIIPNKSEELE ARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLM LLPSYRLESQQTNRKRALDAAYCFRNVQDNCCLR PLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSS DTQHSRVLSTYNTINPEASAPCCVSDLEPLTILYYIG KTPKIEQLSNMIVKSCCKCS	30
npoTGFβ2 D2G	SLSTCSTLDMQDMRKRIRGQILSKLKLTSPPEDYP EPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEE YYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVSA MEKNASNLVKAEFRVRLQNPKEARVPEQRIEL YQILK SKDLTSPQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDVHE WLHHKDRNLGFKISLHPCCTFVPSNNYIIPNKSEELE ARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLM LLPSYRLESQQTNRKRALDAAYCFRNVQDNCCLR PLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSS DTQHSRVLSTYNTINPEASAPCCVSDLEPLTILYYIG KTPKIEQLSNMIVKSCCKCS	31
npoTGFβ3	SLSLSTCTTLDGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPPEPT VMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENT ESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRF NVSSVEKNRNLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQ ILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDVRE WLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIK FKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHPHILMMIPP HRLDNPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCCVRPLY IDFRQDLGWKVVHEPKGYANFCGSPCPYLRADTT HSTVLGLYNTLNPEASAPCCVSDLEPLTILYYVGR KTPKIEQLSNMIVKSCCKCS	32
npoTGFβ3 C7S	SLSLSTSTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPPEPT VMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENT	33

		ESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRF NVSSVEKNRNTNLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQ ILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVRE WLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIK FKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHPHILMMIPP HRLDNPQGGGQRKRALDTNYCFRNLEENCCVRPLY IDFRQDLGWKWWHEPKGYANFCSGPCPYLRSADTT HSTVLGLYNTLNPEASASPCCVQDLEPLTILYYVGRTP PKVEQLSNMVKSCCKCS	
проTGFβ3 D2G	C7S	SLSLSTSTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPT VMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENT ESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRF NVSSVEKNRNTNLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQ ILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVRE WLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIK FKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHPHILMMIPP HRLDNPQGGGQRKALDTNYCFRNLEENCCVRPLYI DFRQDLGWKWWHEPKGYANFCSGPCPYLRSADTTH STVLGLYNTLNPEASASPCCVQDLEPLTILYYVGRTP KVEQLSNMVKSCCKCS	34
проTGFβ3 D2G		SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPT VMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENT ESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRF NVSSVEKNRNTNLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQ ILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVRE WLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIK FKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHPHILMMIPP HRLDNPQGGGQRKALDTNYCFRNLEENCCVRPLYI DFRQDLGWKWWHEPKGYANFCSGPCPYLRSADTTH STVLGLYNTLNPEASASPCCVQDLEPLTILYYVGRTP KVEQLSNMVKSCCKCS	35

Таблица 2

Иллюстративные отличные от человеческих аминокислотные последовательности

Белок	Вид	Последовательность	SEQ ID NO
проTGFβ1	Мышь	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNT SDIREAVPEPPLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQK YSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVVRQW LNQGDGIQGRFSAHCSKSDKNKLHVEINGISPKR RGDLGTIHDNMRPFLLMATPLERAQHLHSSRHRR ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHE PKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASASPCCVQALEPLPIVYVGRPKVEQLSNMIV RSCKCS	36
проTGFβ1	Явански й макак	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNT	37

		SELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQW LSRGGEIEGFRLSAHCSDSKDNTLQVDINGFTTGR RGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRR ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHE PKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMI VRSCCKCS	
TGFβ1 LAP C4S	Мышь	LSTSKTIDMELVKKRRIEAIARGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNT SDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQK YSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQW LNQGDGIQGFRLSAHCSDSKDNKLHVEINGISPKR RGDLGTIHDNMRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHRR	38
TGFβ1 LAP C4S	Явански й макак	LSTSKTIDMELVKKRRIEAIARGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNT SELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQW LSRGGEIEGFRLSAHCSDSKDNTLQVDINGFTTGR RGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRR	39
проTGFβ1 C4S D2G	Мышь	LSTSKTIDMELVKKRRIEAIARGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNT SDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQK YSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQW LNQGDGIQGFRLSAHCSDSKDNKLHVEINGISPKR RGDLGTIHDNMRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHGA LDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP ASAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIV RSCCKCS	40
проTGFβ1 C4S	Мышь	LSTSKTIDMELVKKRRIEAIARGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNT SDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQK YSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQW LNQGDGIQGFRLSAHCSDSKDNKLHVEINGISPKR RGDLGTIHDNMRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHRR ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHE PKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIV RSCCKCS	41
проTGFβ1 C4S	Явански й макак	LSTSKTIDMELVKKRRIEAIARGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNT SELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQW LSRGGEIEGFRLSAHCSDSKDNTLQVDINGFTTGR RGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRR ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHE	42

		PKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMI VRSCCKCS	
проTGFβ1 C4S D2G	Явански й макак	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIKQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNT SELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQW LSRGGIEIEGFRLSAHCSCSDKNTLQVDINGFTTGR RGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHGA LDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP ASAAPCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVR SCKCS	43
LTBP3	Явански й макак	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKG QCRDSCQQGSNMTLIGENGHSTDLTGSFVRVVC PLPCMNGGQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAGGAG GGTGGSGPGLSRAGALSTGALPLAPEGDSVASKH AIYAVQVIADPPGPEGPPAQAHAFLVPLGPGQISA EVQAPPPVNVRVHHPPEASVQVHRIESSNAEGAA PSQHLLPHPKPSHPRPPTQKPLGRCFQDTLPKQPCG SNPLPGLTKQEDCCSIGTAWGQSKCHKCPQLQYT GVQKPGPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINEC AMPGVCRHGDCLNPNPGSYRCVCPGHSGLGPRSTQC IADKPEEKSLCFRLVSPEHQCHPLTTRLTRQLCCC SVGKAWGARCQRCPADGTA AFKEICPAGKGYHILT SHQTLTIQGESDFSLFLHPDGPPKQQLPESPSQAPP PEDTEERGVTTDSPVSEERSVQQSHPTATTSPARP YPELISRPSPTMRWFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTET DECLRNQNICGHGECVPGPPDYSCHCNPGYRSHQP HRYCVDVNECEAEPGPGRGICMNTGGSYNCHCN RGYRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGFCINF PGHYKCNCYPGYRLKASRPPVEDIDECDPSSCPD GKCENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGACRDVNECAE GSPCSPGWCENLPGSFRCTCAQGYAPADGRSCVD VDECEAGDVCNIGICTNTPGSFQCQCLSGYHLSD RSHCEDIDECDFAACIGGDCINTNGSYRCLCPQGH RLVGGKRCQDIDECTQDPGLCLPHGACKNLQGSYV CVCDEGFTPTQDQHGCCEEVEQPHHKKECYLNFDDT VFCDSVLATNVTQQECCSLGAGWGDHCEIYPCPV YSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDEC MLFGAEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYDGNL LECVDVDECLDESNCNRNGVCENTRGGYRCACTPPA EYSPAQRQCLSPEEMDVDECDPAACRPGRCVNL GSYRCECRPPWVPGPSGRDCQLPESPAERAPERD VCWSQRGEDGMCAGPQAGPALTFDDCCCRQGRG WGAQCRPCPPRGAGSQCPTSQSESNSFWDTSPLLL GKPRRDEDSSEEDSDECRVSGRCVPRPGGAVCEC PGGFQLDASRARCVDIDECRELNQRGLLCKSERCV NTSGSFRCVCKAGFARSRPHGACVPQRRR	44
LTBP3	Мышь	GPAGERGTGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKG QCRDSCQQGSNMTLIGENGHSTDLTGSFRVVC	45

		<p>PLPCMNGGQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAAGTG  AGTGSSGPGGLARTGAMSTGPLPLAPEGESVASKH  AIYAVQVIADPPGPGEGPPAQHAAFLVPLGPGQISA  EVQAPPVVNVRVHHPEASVQVHRIEGPNAEGPA  SSQHLLPHPKPPHPRPTQKPLGRCFQDTLPKQPCG  SNPLPGLTKQEDCCSIGTAWGQSKCHKCPQLQYT  GVQKPVVVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINEC  AMPGNVCHGDCLNPNPGSYRCVCPGHSGLPLAAQ  CIADKPEEKSLCFRLVSTEHQCQHPLTTRLTRQLCC  CSVGKAWGARCQRCPADGTA AFKEICPGKGYHILT  SHQTLTIQGESDFSLFLHPDGPQQLPESPSRAPP  LEDTEEERGVMTDPPVSEERSVQQSHPTTTTSPRP  YPELISRSPPTFHRLPDLPPSRSAVEIAPTQVTETD  ECRLNQNICGHGQCVPGPSDYSCHCNAGYRSHQP  RYCVDVNECEAEPGPGKICMNTGGSYNCHCNR  GYRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGFCINFP  GHYKNCYPGYRLKASRPICEDIDECRDPSTCPDG  KCENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGACRDVNECSEG  TPCSPGWENLPGSYRCTAQYEPAQDGLSCIDVD  ECEAGKVCQDGICTNTPGSFQCCLSGYHLSRDRS  RCEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPLGHRL  VGGRKCKKDIDECSDPGLCLPHACENLQGSYVCV  CDEGFTLTQDQHGCEEVEQPHHKKECYLNFDDTVF  CDSVLATNVTQCECCSLGAGWGDHCEIYPCPVYS  SAEFHSLVPDGKRLHSGQQHCELCIPAHRIDECILF  GAEICKEGCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLLEC  VDVDECLDESNCRNGVCENTRGGYRCACTPPAEYS  PAQAQCLIPERWSTPQRDVKCAGASEERTACVWGP  WAGPALTFDDCCCRQRLGTQCRPCPPRGTSQCP  TSQSESNSFWDTSPLLLGKSPRDEDSSEEDSDECRC  VSGRCVPRGGAVCECPGGFQLDASRARCVDIDEC  RELNRGLLCKSERCVNTSGSFRVCVCKAGFTRSRP  HGPAACLSAAADDAIAAHTSVIDHRGYFH</p>	
LTPB1S	Явански й макак	<p>NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNNTTL  ISENGHAADTLTATNFRVVLCHLPCMNGGQCSSRD  KCQCPPNFTGKLCQIPVHGASVPKLYQHSQQPGKA  LGTHTVHSTHTLPLTVTSQQGVKVKFPPNIVNIHVK  HPPEASVQIHQVSRIDGPTGQKTKEAQPQSQVSYQ  GLPVQKTQTIHSTYSHQVIPHVYPVAAKTQLGRFC  QETIGSQCGKALPGLSKQEDCCGTVGTSWGFNKCC  KCPKPSYHGYNQMMECLPGYKRVNNTFCQDINE  CQLQGVCPNGECLNTMGSYRCTCKIGFGPDPTFSSC  VPDPPVISEEKGPCYRLVSSGRQCMHPLSVHLTKQL  CCCSVGKAWGPHCEKCPPLGTA AFKEICPGMGYT  VSGVHRRRPIHHHVKGKGVFVKPKNTQPVAKSTHP  PPLPAKEEPVEALTFREHGPGVAEPEVATAPPEKEI  PSLDQEKTKLEPGQPQLSPGISTIHLPQFPVIEKTS  PPVPVEVAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDI  CGAGHCINLPVRYTCICYEGYKFSEQQRKCVDIDEC  TQVQHLCSQGRCENTEGSFLCICPAGFMASEEGTNC  IDVDECLRPDVCGEHCNVNTVGAFRCEYCDSGYR  MTQRGRCEDIDECCLNPSTCPDEQCVNSPGSYQCV</p>	46

		CTEGFRGWNGQLDVDECLEPNVCTNGDCSNLEG SYMCSCHKGYTRTPDHKHKDIDECQQGNLCVNG QCKNTEGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECQHH HLCAHGQCRNTEGSFQCVCDQGYRASGLGDHCEDI NECLEDKSVCQRGDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDN KTCQDINECEHPGLCGPQGECLNTEGSFHCVCQQG FSISADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCNTAGSFR CLCYQGFQAPQDGGQCVDVNECELLSGVCGEAF ENVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRSRVSTDLDV EQPKKEKKECYYNLDASLCDNVLAPNVTKQECC CTSGAGWGDNCEIFPCVLTAEFTMCPKGGKGFV PAGESSEAGGENYKDADECLLFGQEICKNGFCLNT RPGYECYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPSSCID GQCVNTEGSYNCFCTHPMVLDASEKRCIRPAESNE QIEETDYYQDLCWEHLSDEYVCSRPLVKGQTTYTE CCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYAQLCNIPVTG RRQPYGRDALVDFSEQYAPEADPYFIQDRFLNSFEE LQAEECGILNGCENGRVVRVQEGYTCDFDGYHLD TAKMTCVDVNECEDELNNRMSLCKNAKCINTEGSY KCLCLPGYVPSDKPNYCTPLNTALNLEKDSLE	
LTBP1S	Мышь	NHTGRIKVVFTSICKVTCTKGNCQNSCQKGNNTTL ISENGHAADTLTATNFRVVICHLPCMNGGQCSSRD KCQCPPNFTGKLCQIPVLGASMPKLYQHAQQQGA LGSVHISTHTLPLTMTSQQGVKVKFPNIVNIHVK HPPEASVQIHQVSRIDSPGGQKVKEAQPQSQVSYQ GLPVQKTQTVHSTYSHQQLIPHVYPVAAKTQLGRC FQETIGSQCGKALPGLSKQEDCCGTGTSWGFNKC QKCPKKQSYHGYTQMMELQGYKRVNNTFCQDIN EQQLQGVCPNGECLNTMGSYRCSCKMGFGPDPFIS SCVPDPPVISEEKGPCYRLVSPGRHCMHPLSVHLTK QICCCSVGKAWGPHCEKCPGTAAFKEICPGGMG YTVSGVHRRRPIHQHIGKEAVYVKPKNTQPVAKST HPPPLPAKEEPVEALTSSWEHGPRGAEPEVVTAPPE KEIPSLDQEKTRLEPGQPQLSPGVSTIHLHPQFPVVV EKTSPVPVEVAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECTV NPDICGAGHCINLPVRYTCICYEGYKFSEQLRKCVD IDECAQVRHLCSQGRCENTEGSFLCVCAPAGFMASE EGTNCIDVDECLRPMCRDGRDCINTAGAFRCEYCD SGYRMSRRGYCEDIDECLKPSTCPEEQCVNTPGSYQ CVPCTEGFRGWNGQLDVDECLQPKVCTNGSCTN LEGSYMCCHRGYSPDHRHCQDIDECQQGNLCM NGQCRNTDGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECE HHHLCSHGQCRNTEGSFQCVCNQGYRASVLGDHC EDINECLEDDSSVCQGGDCINTAGSYDCTCPDGFQLN DNKGCQDINECAQPGLCGSHGECLNTQGSFHCVCE QGFSISADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCNTAGS FRCLCYQGFQAPQDGGQCVDVNECELLSGVCGEAF CENVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRSRVTEDSG VDRQPREEKKECYYNLDASLCDNVLAPNVTKQE CCCTSGAGWGDNCEIFPCVQGTAEFTMCPRGKG LVPAGESYDTGGENYKDADECLLFGEEICKNGYC LNTQPGYECYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPN	47

		SCIDGQCVNTEGSYNCFCTHPMVLDASEKRCVQPT ESNEQIEETDVYQDLCWEHLSEEYVCSRPLVKGQT TYTECCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYAQLCNI PVTGRRRPYGRDALVDFSEYGPETDPYFIQDRFLN SFEELQAECEGILNGCENGRCVVRVQEGYTCDCFDG YHLDMAKMTCDVNECSELNRMRLCKNAKCINT EGSYKCLCLPGYIPSDKPNYCTPLNSALNLDKESDL E	
GARP	Мышь	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQ ALYLSGNQLQSILVSPLGFYALRHLDLSDNQISFLQ AGVFQALPYLEHLNLAHNRLATGMALNSGGGLGRL PLLVSLLDLSGNLSLHGNIIVERLLGETPRLRRLSLAEN SLTRLARHTFWGMPAVEQLDLHSNVLMIEDGAFE ALPHLTHLNLRSNLSLTCISDFSLQQLQVLDLSCNSIE AFQTAPEPQAQFQLAWLDLRENKLLHFPDLAVFPR LIYLVNSNLIQLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSASPLS NPSRNASTHPLSQLLNLDLSYNEIELVPASFLEHLTS LRFNLNLSRNCLRSFEARQVDSLPCLVLLDLSHNVLE ALELGTKVLGSLQTLQLQDNALQELPPYTFASLASL QRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFSGIPTLHVL NMAGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVA TGALVGLEASLEVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLK RLNLAENQLSHLPAWTRAVSLEVLDLRNNSFSLLP GNAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLH QGRVDVATQDLICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKG GLKNNVNLILLLSFTLVSAIVLTTLATICFLRRQKLSQ QYKA	48
sGARP	Мышь	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQ ALYLSGNQLQSILVSPLGFYALRHLDLSDNQISFLQ AGVFQALPYLEHLNLAHNRLATGMALNSGGGLGRL PLLVSLLDLSGNLSLHGNIIVERLLGETPRLRRLSLAEN SLTRLARHTFWGMPAVEQLDLHSNVLMIEDGAFE ALPHLTHLNLRSNLSLTCISDFSLQQLQVLDLSCNSIE AFQTAPEPQAQFQLAWLDLRENKLLHFPDLAVFPR LIYLVNSNLIQLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSASPLS NPSRNASTHPLSQLLNLDLSYNEIELVPASFLEHLTS LRFNLNLSRNCLRSFEARQVDSLPCLVLLDLSHNVLE ALELGTKVLGSLQTLQLQDNALQELPPYTFASLASL QRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFSGIPTLHVL NMAGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVA TGALVGLEASLEVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLK RLNLAENQLSHLPAWTRAVSLEVLDLRNNSFSLLP GNAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLH QGRVDVATQDLICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKG GLKNNV	49

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенные белковые комплексы (например, комплекс LTBP-TGFβ1) могут содержать один или несколько белков LTBP (например, LTBP1, LTBP2, LTBP3 и LTBP4) или их фрагмент(ы). Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть способно связываться с комплексом LTBP1-TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 представляет собой встречающийся в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 представляет собой не встречающийся в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 представляет собой рекомбинантный белок. Такой рекомбинантный белок LTBP1 может содержать LTBP1, его альтернативно сплайсированные варианты и/или его фрагменты. Рекомбинантные белки LTBP1 также могут быть модифицированы для включения одной или нескольких обнаруживаемых меток. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 содержит лидерную последовательность (например, нативную или ненативную лидерную последовательность). Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 не содержит лидерную последовательность (т.е. лидерная последовательность была процессирована или расщеплена). Такие обнаруживаемые метки могут включать в себя, без ограничения, биотиновые метки, полигистидиновые метки, тус-метки, HA-метки и/или флуоресцентные метки. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 представляет собой белок LTBP1 млекопитающих. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 представляет собой белок LTBP1 человека, обезьяны, мыши или крысы. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46 и 47 в табл. 2. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50 в табл. 3.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть способно связываться с комплексом LTBP3-TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 представляет собой встречающийся в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 представляет собой не встречающийся-

ся в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 представляет собой рекомбинантный белок. Такой рекомбинантный белок LTBP3 может содержать LTBP3, его альтернативно сплайсированные варианты и/или их фрагменты. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 содержит лидерную последовательность (например, нативную или ненативную лидерную последовательность). Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 не содержит лидерной последовательности (т.е. лидерная последовательность была процессирована или расщеплена). Рекомбинантные белки LTBP3 также могут быть модифицированы для включения одной или нескольких обнаруживаемых меток. Такие обнаруживаемые метки могут включать в себя, без ограничения, биотиновые метки, полигистидиновые метки, тус-метки, HA-метки и/или флуоресцентные метки. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 представляет собой белок LTBP3 млекопитающих. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 представляет собой белок LTBP3 человека, обезьяны, мыши или крысы. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44 и 45 в табл. 2. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51 в табл. 3.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть способно связываться с комплексом GARP-TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP представляет собой встречающийся в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP представляет собой не встречающийся в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP представляет собой рекомбинантный белок. Такой GARP может быть рекомбинантным, называемым в настоящем документе рекомбинантным GARP. Некоторые рекомбинантные GARP могут содержать одну или несколько модификаций, усечений и/или мутаций по сравнению с GARP дикого типа. Рекомбинантные GARP могут быть модифицированы, чтобы быть растворимыми. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP содержит лидерную последовательность (например, нативную или ненативную лидерную последовательность). Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP не содержит лидерной последовательности (т.е. лидерная последовательность была процессирована или отщеплена). Согласно другим вариантам осуществления рекомбинантные GARP модифицированы для включения одной или нескольких обнаруживаемых меток. Согласно другим вариантам осуществления такие обнаруживаемые метки могут включать в себя, без ограничения, биотиновые метки, полигистидиновые метки, flag-метки, тус-метки, HA-метки и/или флуоресцентные метки. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP представляет собой белок GARP млекопитающих. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP представляет собой белок GARP человека, обезьяны, мыши или крысы. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48-49 в табл. 2. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52 и 53 в табл. 4. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела или их антигенсвязывающие части не связываются с TGFβ1 зависимым от контекста образом, например, связывание с TGFβ1 будет происходить только тогда, когда молекула TGFβ1 образует комплекс со специфичной презентующей молекулой, такой как GARP. Вместо этого антитела и их антигенсвязывающие части связываются с TGFβ1 независимым от контекста образом. Другими словами, антитела или их антигенсвязывающие части связываются с TGFβ1 при связывании с любой презентующей молекулой: GARP, LTBP1, LTBP3 и/или LRCC33.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть способно связываться с комплексом LRRC33-TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 представляет собой встречающийся в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 представляет собой не встречающийся в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 представляет собой рекомбинантный белок. Такой LRRC33 может быть рекомбинантным, называемым в настоящем документе как рекомбинантный LRRC33. Некоторые рекомбинантные белки LRRC33 могут содержать одну или несколько модификаций, усечений и/или мутаций по сравнению с LRRC33 дикого типа. Рекомбинантные белки LRRC33 могут быть модифицированы, чтобы быть растворимыми. Например, согласно некоторым вариантам осуществления эктодомен LRRC33 может быть экспрессирован с C-концевой His-меткой для экспрессии растворимого белка LRRC33 (sLRRC33; смотрите, например, SEQ ID NO: 84). Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 содержит лидерную последовательность (например, нативную или ненативную лидерную последовательность). Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 не содержит лидерной последовательности (т.е. лидерная последовательность была процессирована или расщеплена). Согласно другим вариантам осуществления рекомбинантные белки LRRC33 модифицированы для включения одной или нескольких обнаруживаемых меток. Согласно другим вариантам осуществления такие обнаруживаемые метки могут включать в себя, без ограничения, биотиновые метки, полигистидиновые метки, flag-метки, тус-метки,

НА-метки и/или флуоресцентные метки. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 представляет собой белок LRRC33 млекопитающих. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 представляет собой белок LRRC33 человека, обезьяны, мыши или крысы. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ Ш N0: 83, 84 и 101 в таблице 4.

Таблица 3  
Иллюстративные аминокислотные последовательности LTBP

Белок	Последовательность	SEQ ID NO
LTBP1S	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTLI SENGHAADTLTATNFRVVICHLPCMNGGQCSSRDK CQCPNFTGKLCQIPVHGASVPKLYQHSQQPGKALG THVIHSTHTLPLTVTSQQGVKVKFPPNIVNIHVKHPP EASVQIHQVSRIDGPTGQKTEAQPQSQSVSYQGLP VQKTQTIHSTYSHQQVIPHYVPAAKTQLGRCFQETI GSQCGKALPGLSKQEDCCGTVGTSWGFKCQKCPK KPSYHGYNQMMELCPGYKRVNNTFCQDINECQLQG VCPNGECLNTMGSYRCTCKIGFGDPDTFSSCVDPDPV ISEEKGPCYRLVSSGRQCMHPLSVHLTKQLCCCSVG KAWGPHCEKCLPGTAAFKEICPGMGYTVSGVHR RRPIHHVVGKGPVFKPKNTQPVAKSTHPPPLPAKE EPVEALTFSREHGPVAAEPEVATAPPEKEIPSLDQEK TKLEPGQPQLSPGISTHILHPQFPVIEKTSPPVPVEV APEASTSSASQVIAPTQVTEINCTVNPDICGAGHCIN LPVRYTCICYEGYRFSEQQRKCVDIDECTQVQHLCS QGRCENTEGSFLCICPAGFMASEEGTNCIDVDECLRP DVCGEHCVNTVGAFRCEYCDSGYRMTQRGRCEDI DECLNPSTCPDEQCVNSPGSYQCVPTTEGFRGWNG QCLDVDECLPNVCANGDCSNLEGSYMCSCHKGYT RTPDHKHCRDIDECCQGNLCVNGQCKNTEGSRFCT CGQGYQLSAAKDQCEDIDECQHRHLCAHGQCRNTE GSFQVCVCDQGYRASGLGDHCEINECLEDKSVCQR GDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDNKTCQDINECEHPG LCGPQGECLNTEGSHFCVCQGFSSISADGRTECEIDE CVNNTVCDSHGFCDNTAGSFRCLCYQGFQAPQDGG GCVDVNECELLSGVCGEAFCEVEGSLFCVCADEN QEYSPMTGQCRSRTSTDLDVDVDQPKKEKKECYYN LNDASLCDNVLAPNVTKQECCTSGVGVGDNCEIF PCPVLGTAEFTMCPKGGKGFVPAGESSEAGGENYK DADECLLFGQEICKNGFCLNTRPGYECYCKQGTYY DPVKLQCFDMDECQDPSSCIDGQCVNTEGSYNCFCT HPMVLDASEKRCIRPAESNEIEETDVYQDLCWEHL SDEYVCSRPLVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALC PLKDSDDYAQLCNIPVTGRRQPYGRDALVDFSEQYT PEADPYFIQDRFLNSFEELQAEECGILNGCENGRV VQEGYTCDFDGYHLDATAKMTCDVNECDELNNR MSLCKNAKCINTDGSYKCLCLPGYVPSDKPNYCTPL NTALNLEKDSLE	50
LTBP3	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKG QCRDSCQQGSNMTLIGENGHSTDLTGSGFRVVVCP LPCMNGGQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAGGAGG GTGGSGPGLSRTGALSTGALPLLAPEGDSVASKHAI	51

	YAVQVIADPPGPGEGPPAQHAAFLVPLGPGQISAEV QAPPPVVNVRVHHPPEASVQVHRIESSNAESAAPSQ HLLPHKPSHPRPPTQKPLGRCFQDTLPKQPCGSNPL PGLTKQEDCCSIGTAWGQSKCHKCPQLQYTGTVQK PGPVRGEV GADCPQGYKRLNSTHCQDINECAMPGV CRHGDCLNPGSYRCVCPGHS LGPSRTQCIADKPE EKSLCFRLV SPEHQHQHPLTTRLTRQLCCCSVGKAW GARCQRCP TDGTA AFKEICPAGKGYHILTSHTLTIQ GESDFSLFLHPD GPPKQQLPESPSQAPPPEDTEEERG VTTDSPVSEERSVQQSHPTATTT PARPYPELISRPSPP TMRWFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTETDECLRNQNICG HGECVPGPPDYSCHCNPGYRSHPQHRYCVDVNECE AEP CGPGRGICMNTGGSYNCHCNRGYRLHVGAGGR SCVDLNECAKPHLCGDGGFCINFPGHYKCNCPYGY RLKASRPPVCEIDECRDPSSCPDGKCNKPGSFKCI ACQPGYRSQGGGACRDVNECAEGSPCSPGWCENLP GSFRC TCAQGYAPAPDGRSCLDVDECEAGDVCDNG ICSNTPGSFQCQLSGYHLSRDRSHCEDIDECDFPAA CIGGDCINTNGSYRCLCPQGHRLVGGRRKQDIDECES QDPSLCLPHGACKNLQGSYVCVDEGFTPTQDQHG CEEVEQPHHKKECYLNFD DTVFCDSVLA TNVTQQE CCCSLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGY TQDNNIVNYGIP AHRDIDECMLFGSEICKEGKCVNT QPGYECYCKQGFYDGNLLECVDVDECLDESNCRN GVCENTRGGYRC ACTPPAEYSPAQRQCLSPEEMDV DECQDPAACRPGRCVNLPGSYRCECRPPWVPGPSGR DCQLPESPAERAPERRDVCWSQRGEDGMCAGPLAG PALTFDDCCCRQGRGWAQCRPCPPRGAGSHCPTS QSESNSFWDTSPLLL GKPPREDSSEEDSDECRCSVG RCVPRPGGAVCECPGGFQLDASRARCVDIDECRELN QRGLLCKSERCVNTSGSFRVCVKAGFARSRPHGACV PQRRR	
--	---	--

Таблица 4

## Иллюстративные аминокислотные последовательности GARP и LRRC33

Белок	Последовательность	SEQ ID NO
GARP	AQHQDKVPCKMVDKVKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTEF LDLSGNQLRSILASPLGFYALRHLDLSTNEISFLQPGA FQALTHLEHLSLAHNRLAMATALSAGGLGPLPRVTSL DLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRH TFRDMPALEQLDLHSNVLMIEDGAFEGLPRLTHLNL SRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEF QLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPT GPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSLLN LDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARR LGSLPCLMLLDLSHNALETLELGARALGSLR TLLLQG NALRDLPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPG PSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAF LHTPLTEL	52

	DLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLAQGNGLMVQ VDLPCFICKRLNLAENRSLHLPAAWTQAVSLEVLDLR NNSFSLPGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWL AAQLHQGRVDVDATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDC EKGGLKNINLIILTFILVSAILLTTLAACCCVRRQKFNQ QYKA	
sGARP	AQHODKVPCKMVDKKVSCQVLGGLQVPSVLPDDET LDLSGNQLRSILASPLGFYALRHLDLSTNEISFLQPGA FQALHLEHLSLAHNRLAMATALSAGGLGPLPRVTSL DLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRH TFRDMPALEQLDLHSNVLMIEDGAFEGPLRHLTHLNL SRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEF QLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPT GPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSQLLN LDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARR LGSPLCLMLLDLSHNALETLELGARALGSLRLLLQ NALRDLPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPG PSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFHTPLTEL DLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLAQGNGLMVQ VDLPCFICKRLNLAENRSLHLPAAWTQAVSLEVLDLR NNSFSLPGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWL AAQLHQGRVDVDATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDC EKGGLKNIN	53
LRRС33 (также известный как NRR0S; № доступа Uniprot Q86YC3)	<b>MELLPLWLCLGFHFLTVGWRNRS</b> GTATAASQGV KLVGGAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKT LWNHSLQPYPLEESLHSCHLERISRGAFAQGHLS LVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRLDLSGNALTE DMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERL RELDLQRNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLAFNNLPCIV DFGLTRLRVLNVSYNVLEWFLATGGEAAFELETLDLS HNQLLFFPLLPQYSKLRLLLLRDNNMGFYRDLYNTSS PREMVAQFLLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDLADLRF LDMSQNQFQYLPDGFRLKMPSLSHLNHLHQNCLMTLHI REHEPPGALTELDLSHNQLSELHLAPGLASCLGSLRLF NLSSNQLLGVPPGLFANARNITTLDMSHNQISLCPPLA ASDRVGPSPCVDFRNMAASLRSLSLEGCGLGALPDCPF QGTSLTYLDLSSNWGVNLGSLAPLQDVAPMLQVLSL RNMGLHSSFMALDFSGFNLRLDLDLSGNCLTTFPRFG GSLALETDLRRNSLTALPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQ NPYDCCGVGDGALQHGQTVADWAMVTCNLSSKII RVTELPGGVPRDCKWERLDLGLLYLVILPCLTLLV ACTVIVLTFKKPLLQVIKSRCHWSSVY	83
Растворимый LRRС33 (sLRRС33)	<b>MDMRVPAQLLGLLLLWFSGLV</b> GWRNRS GTATAASQGVCKLVGGAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLD ANPLKTLWNHSLQPYPLEESLHSCHLERISRGAFAQ GHLSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRLDLSG NALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFE GLERLRELDLQRNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLAFN NLPCIVDFGLTRLRVLNVSYNVLEWFLATGGEAAFELE	84

\*Нативный сигнальный пептид изображен жирным шрифтом

	<p>TLDSLHNQLLFFPLLPQYSKLRITLLLRDNNMGFYRDL YNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDL ADLRFLDMSQNFQYLPDGFRLKMPSLSHLNLHQNC LMTLHIREHEPPGALTELDLSHNQLSELHLAPGLASCL GSLRLFNLSNQLLGVPPGLFANARNITTLDMSHNQIS LCPLPAASDRVGGPSCVDFRNMAASLRSLSEGCGLGA LPDCPFQGTSLTYLDLSSNWGVLNGLAPLQDVAPML QVLSLRNMGLHSSFMALDFSGFGNLRDLDLSGNCLTT FPRFGGSLALETDLRRNSLTALPQKAVSEQLSRGLRT IYLSQNPYDCCGVDGWGALQHGQTVADWAMVTCNL SSKIIRVTELPGGVPRDCKWERLDLGL<u>HHHHHH</u></p> <p>*Модифицированный сигнальный пептид легкой цепи каппа человека изображен жирным шрифтом. **Гистидиновая метка подчеркнута.</p>	
Химера LRRС33- GARP человека	<p><b>MDMRVPAQLLGLLLWFSGVLGWRNRSQTATAAS</b> <b>QGVC</b>KLVGGAADCRGQSLASVPSLPPHARMITLDA <u>NPLKTLWNHSLQPYPLESLHLSCHLERISRGAFQEQ</u> <u>GHLRSLVLDGNCLSENYEETAALHALPGLRRDLDSG</u> <u>NALTEDMAALMLQNLSSLRVSVLAGNTIMRLDDSVFE</u> <u>GLERLRELDLQRNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLAFNL</u> <u>LPCIVDFGLTRLRVLNVSYNVLEWFLATGGEEAAFELE</u> <u>TLDSLHNQLLFFPLLPQYSKLRITLLLRDNNMGFYRDL</u> <u>YNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDL</u> <u>ADLRFLDMSQNFQYLPDGFRLKMPSLSHLNLHQNC</u> <u>LMTLHIREHEPPGALTELDLSHNQLSELHLAPGLASCL</u> <u>GSLRLFNLSNQLLGVPPGLFANARNITTLDMSHNQIS</u> <u>LCPLPAASDRVGGPSCVDFRNMAASLRSLSEGCGLGA</u> <u>LPDCPFQGTSLTYLDLSSNWGVLNGLAPLQDVAPML</u> <u>QVLSLRNMGLHSSFMALDFSGFGNLRDLDLSGNCLTT</u> <u>FPRFGGSLALETDLRRNSLTALPQKAVSEQLSRGLRT</u> <u>IYLSQNPYDCCGVDGWGALQHGQTVADWAMVTCNL</u> <u>SSKIIRVTELPGGVPRDCKWERLDLGLLILTFILVSAIL</u> <u>LTTLAACCCVRRQKFNQOYKA</u></p> <p>* Модифицированный сигнальный пептид легкой цепи каппа человека изображен жирным шрифтом. **Эктодомен LRRС33 подчеркнут. #Трансмембранный домен GARP выделен курсивом. ##Внутриклеточный хвост GARP подчеркнут двойной линией.</p>	101

#### Антагонисты TGFβ1.

Для осуществления способов по настоящему изобретению могут быть использованы любые подходящие ингибирующие средства TGFβ1 при условии, что такие средства ингибируют или выступают антагонистами TGFβ1 при множественных биологических эффектах (например, TGFβ1 из множества клеточных источников) с достаточной селективностью в отношении изоформы TGFβ1. Предпочтительно, чтобы такие ингибирующие средства TGFβ1 не имели измеримых ингибирующих активностей в отношении TGFβ2 и TGFβ3 в дозировке, которая обеспечивает клинические преимущества (например, терапевтическую эффективность и приемлемые профили токсичности) при введении субъектам-людям. Подходящие ингибирующие средства включают в себя малые молекулы, средства на основе нуклеиновых кислот, биологические вещества (например, средства на основе полипептидов, такие как антитела и другие детектирующие средства) и любые их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления такие средства представляют собой антитела или их фрагменты, как дополнительно описано ниже. К ним относятся нейтрализующие антитела, которые связываются с фактором роста TGFβ1, тем самым нейтрализуя его действие.

Функциональные антитела, которые избирательно ингибируют TGFβ1 Настоящее изобретение согласно одному аспекту охватывает применение функциональных антител. Используемый в настоящем документе термин "функциональное антитело" придает одну или несколько биологических активностей благодаря своей способности связываться с антигеном. Поэтому функциональные антитела включают в себя антитела, способные модулировать активность/функцию молекул-мишеней (т.е. антигена). Такие модулирующие антитела включают в себя ингибирующие антитела (или ингибиторные антитела) и активирующие антитела. Настоящее раскрытие включает в себя антитела к TGFβ, которые могут ингибировать биологический процесс, опосредованный передачей сигналов TGFβ1, связанный с множеством контекстов TGFβ1. Ингибиторные средства, используемые для осуществления настоящего изобретения, такие как описанные в настоящем документе антитела, предназначены быть селективными в отношении TGFβ1 и не нацелены или не влияют на TGFβ2 и TGFβ3 при введении в терапевтически эффективной дозе (дозе, при которой достигается достаточная эффективность в пределах допустимых уровней токсичности).

Опираясь на более раннее признание заявителем настоящего раскрытия (смотрите PCT/US2017/021972), что отсутствие специфичности к изоформе традиционных антагонистов TGFβ мо-

жет лежать в основе источника токсичности, связанной с ингибированием TGF $\beta$ , авторы настоящего изобретения стремились к дальнейшему достижению ингибирования широкого спектра TGF $\beta$ 1 для лечения различных заболеваний, которые проявляют многогранную дисрегуляцию TGF $\beta$ 1, сохраняя при этом аспект безопасности/переносимости селективных к изоформе ингибиторов.

В широком смысле термин "ингибирующее антитело" относится к антителу, которое противодействует или нейтрализует целевую функцию, например, активность фактора роста. Преимущественно предпочтительные ингибирующие антитела по настоящему изобретению способны ингибировать высвобождение зрелого фактора роста из латентного комплекса, тем самым снижая передачу сигналов фактора роста. Ингибирующие антитела включают в себя антитела, нацеленные на любой эпитоп, который снижает высвобождение фактора роста или активность при связывании с такими антителами. Такие эпитопы могут лежать на продоменах белков TGF $\beta$  (например, TGF $\beta$ 1), факторов роста или других эпитопов, которые приводят к снижению активности фактора роста при связывании с антителом. Ингибирующие антитела по настоящему изобретению включают в себя, без ограничения, ингибирующие TGF $\beta$ 1 антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующие антитела по настоящему изобретению специфично связывают комбинированный эпитоп, т.е. эпитоп, образованный двумя или более компонентами/частями антигена или комплекса антигенов. Например, комбинаторный эпитоп может быть образован за счет вкладов от нескольких частей одного белка, т.е. аминокислотных остатков из более чем одного несмежного сегмента одного и того же белка. Альтернативно, комбинаторный эпитоп может быть образован за счет вкладов от множества белковых компонентов антигенного комплекса. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующие антитела по настоящему изобретению специфично связывают конформационный эпитоп (или специфичный к конформации эпитоп), например, эпитоп, который чувствителен к трехмерной структуре (т.е. конформации) антигена или комплекса антигенов.

Традиционные подходы к противодействию передаче сигналов TGF $\beta$  заключались в том, чтобы: i) непосредственно нейтрализовать зрелый фактор роста после того, как он уже стал активным, с тем чтобы истощить свободные лиганды (например, высвобожденные из его латентного комплекса-предшественника), которые доступны для связывания с рецептором; ii) использовать растворимые фрагменты рецептора, способные изолировать свободные лиганды (например, так называемые ловушки лигандов); или iii) направленно воздействовать на его рецептор(ы) на клеточной поверхности, чтобы блокировать взаимодействия лиганд-рецептор. Каждый из этих традиционных подходов требует, чтобы антагонист конкурировал с эндогенными аналогами. Кроме того, первые два подхода (i и ii) выше нацелены на активный лиганд, который является временной формой. Следовательно, такой антагонист должен быть способен кинетически превзойти эндогенный рецептор в течение короткого временного окна. Третий подход может обеспечить более длительный эффект при сравнении, но непреднамеренно приводит к нежелательным ингибирующим эффектам (следовательно, возможной токсичности), поскольку многие факторы роста (например, до ~20) передают сигналы через один и тот же рецептор(ы).

Чтобы обеспечить решение этих недостатков и дополнительно обеспечить большую селективность и локализованное действие, предпочтительный механизм действия, лежащий в основе ингибирующих антител, таких как описанные в настоящем документе, действует раньше активации TGF $\beta$ 1 и взаимодействия лиганд-рецептор. Таким образом, предполагается, что специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1, подходящие для осуществления настоящего изобретения, должны предпочтительно нацеливаться на неактивный (например, латентный) комплекс предшественника TGF $\beta$ 1 (например, комплекс, содержащий про/латентный TGF $\beta$ 1) до его активации, чтобы заблокировать стадию активации у ее источника (например, в микроокружении заболевания). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения такие ингибиторы нацелены на ЕСМ-ассоциированные и/или ассоциированные с поверхностью клетки про/латентные комплексы TGF $\beta$ 1, а не на свободные лиганды, которые временно доступны для связывания с рецептором.

Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения используются средства, которые специфично связываются с TGF $\beta$ 1-содержащими комплексами, тем самым ингибируя функцию TGF $\beta$ 1 селективным к изоформе образом. Такие средства предпочтительно представляют собой антитела, которые связывают эпитоп внутри белкового комплекса, содержащего про/латентный TGF $\beta$ 1 (например, неактивный предшественник TGF $\beta$ 1). Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп доступен для связывания антителом, когда TGF $\beta$ 1 присутствует в двух или более из следующих компонентов: комплекс GARP-TGF $\beta$ 1, комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1 и комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие антитела связывают два или более из представленных выше TGF $\beta$ 1-содержащих комплексов (например, "пермиссивные по отношению к контексту"), тогда как согласно другим вариантам осуществления такие антитела связывают все четыре из представленных выше TGF $\beta$ 1-содержащих комплексов (например, "независимые от контекста"). Согласно некоторым вариантам осуществления любое из таких антител может проявлять дифференциальную селективность к формам. Эпитоп может находиться в про-доме комплекса TGF $\beta$ 1. Эпитоп может представлять собой комбинированный эпитоп, так что эпитоп образован двумя или более

частями/сегментами (например, аминокислотными остатками) одного или нескольких компонентов комплекса. Эпитоп может представлять собой конформационный эпитоп, так что эпитоп чувствителен к конкретной трехмерной структуре антигена (например, комплекс TGFβ1). Антитело или его фрагмент, который специфично связывается с конформационным эпитопом, называют конформационным антителом или специфичным к конформации антителом.

Варианты осуществления настоящего раскрытия включают в себя способы применения ингибирующих антител в растворе, в культуре клеток и/или у субъектов для модификации передачи сигналов фактора роста, в том числе для целей предоставления клинического преимущества пациентам.

Иллюстративные антитела и соответствующие последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют антитела, применимые для осуществления настоящего изобретения, включают в себя одну или несколько аминокислотных последовательностей CDR, показанных в табл. 5.

Таблица 5  
Определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH) и легкой цепи (CDRL), определенные с использованием схемы нумерации Kabat, показаны для антител Ab1 Ab2 и Ab3

Антитело	Ab1	Ab2	Ab3
CDRH1	SYGMH (SEQ ID NO: 1)	SDWIG (SEQ ID NO: 2)	NYAMS (SEQ ID NO: 85)
CDRH2	VISYDGSNKYYADSV KG (SEQ ID NO: 3)	VYYPGDSSTRYSAS FQG (SEQ ID NO: 4)	SISGSGGATYYADSVK G (SEQ ID NO: 86)
CDRH3	DIRPYGDYSAAFDI (SEQ ID NO: 5)	AAGIAAAGHVTA FI (SEQ ID NO: 6)	ARVSSGHWFDFY (SEQ ID NO: 87)
CDRL1	TGSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 7)	KSSQSVLYSSNNKN YLA (SEQ ID NO: 8)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 88)
CDRL2	EDNQRPS (SEQ ID NO: 9)	WASTRES (SEQ ID NO: 10)	SSLQS (SEQ ID NO: 89)
CDRL3	QSYDSSNHGGV (SEQ ID NO: 11)	QYYSTPVT (SEQ ID NO: 12)	QQSYSAPFT (SEQ ID NO: 90)

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, включают в себя любое антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащую CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 или CDRL3 или их комбинации, как предусмотрено для любого из антител, показанных в табл. 5. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, включают в себя CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 любого из антител, показанных в табл. 5. В настоящем изобретении также предусмотрена любая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу, содержащую CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 или CDRL3, как предусмотрено для любого из антител, показанных в табл. 5. Домены CDR3 тяжелой и легкой цепи антитела могут играть особенно важную роль в специфичности связывания/аффинности антитела к антигену. Соответственно, антитела, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1 по настоящему раскрытию, или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие эти антитела или их антигенсвязывающие части, могут включать в себя по меньшей мере CDR3 тяжелой и/или легкой цепи антител, как показано в табл. 5.

Аспекты настоящего изобретения относятся к моноклональному антителу или его антигенсвязывающей части, которая специфично связывается с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, и которая содержит шесть определяющих комплементарность областей (CDR): CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3.

Согласно некоторым вариантам осуществления CDRH1 содержит последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1, 2 и 85. Согласно некоторым вариантам осуществления CDRH2 содержит последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 3, 4 и 86. Согласно некоторым вариантам осуществления CDRH3 содержит последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 5, 6 и 87. CDRL1 содержит последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 7, 8 и 88. Согласно некоторым вариантам осуществления CDRL2 содержит последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 9, 10 и 89. Согласно некоторым вариантам осуществления CDRL3 содержит последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 11, 12 и 90.

Согласно некоторым вариантам осуществления (например, что касается антитела Ab1, показанного в табл. 5), антитело или его антигенсвязывающая часть, которая специфично связывается с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, содержит: CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ





риабельного домена тяжелой цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся идентичностью, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 96, и аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся идентичностью, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 98. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 96, и аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 98.

В некоторых примерах любое из антител по настоящему раскрытию, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, включает в себя любое антитело (включая в себя их антигенсвязывающие части), содержащее одну или несколько последовательностей CDR (например, CDRH или CDRL), по существу сходных с CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и/или CDRL3. Например, антитела могут включать в себя одну или несколько последовательностей CDR, как показано в табл. 5 (SEQ ID NO: 1-12 и 85-90), содержащих до 5, 4, 3, 2 или 1 вариацию аминокислотных остатков по сравнению с соответствующей областью CDR в любой из SEQ ID NO: 1-12 и 85-90. Полные аминокислотные последовательности для вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антител, перечисленных в табл. 5 (например, Ab1, Ab2 и Ab3), а также последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антител, приведены ниже.

Ab1-Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK  
YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIRPYGDYSAAFDIWGQG  
TLVTVSS (SEQ ID NO: 13)

Ab1-Последовательность нуклеиновой кислоты вариабельной области тяжелой цепи

GAGGTGCAACTCGTGGAGTCAGGCGGTGGACTTGTTACAGCCTGGGCGAAGTCTGAG  
ACTCTCATGTGCAGCAAGTGGATTCACCTTCTCCAGTTACGGCATGCACTGGGTGAG  
ACAGGCGCCTGAAAAGGGTTTGAATGGGTCGCTGTGATCTTTACGACGGGTCAA  
ACAAATATTACGCGGATTCAGTGAAGGGCGGTTCACTATTTACGGGATAACTCCA  
AGAACACCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGAGGGCAGAGGACACCGCTGTGTAC  
TATTGTGCCCGGGACATAAGGCCTTACGGCGATTACAGCGCCGCATTTGATATTTGG  
GGACAAGGCACCCTTGTGACAGTATCTTCT (SEQ ID NO: 91)

Ab1-Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPSIVIFEDNQRPSPGAPD  
RFGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNHGGVFGGGTQLTVL (SEQ ID NO:  
14)

Ab1-Последовательность нуклеиновой кислоты вариабельной области легкой цепи

AATTTTATGCTTACCCAACCACATAGTGTGAGTGAGTCTCCCGCAAGACTGTAACA  
ATTTTCATGTACCGGCAGCAGTGGCTCCATCGCTAGCAATTATGTGCAATGGTACCAA  
CAGCGCCCCGGGAGCGCACCTTCAATAGTGATATTCGAGGATAACCAACGGCCTAG  
TGGGGCTCCCGATAGATTTAGTGGGAGTATAGATAGCTCCTCCAACCTGCCTCTCT  
CACCATTAGCGGGCTGAAAACAGAGGATGAAGCCGACTATTACTGCCAAAGCTATG  
ATTCTAGCAACCACGGCGGAGTGTGGCGGAGGAACACAGCTGACAGTCTTAGG  
(SEQ ID NO: 92)

Ab1-Аминокислотная последовательность тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK  
YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIRPYGDYSAAFDIWGQG  
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF  
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPPAPE  
FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL  
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLT  
VDKSRWQEGNVSFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 15)

- Ab1-Аминокислотная последовательность легкой цепи**  
 NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPSIVIFEDNQRPSPGAPD  
 RFSGSDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNHGGVFGGGTQLTVLGGPQAAPSV  
 TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAA  
 SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 16)
- Ab2-Аминокислотная последовательность вариabельной области тяжелой цепи**  
 EVQLVQSGAEMKPKGESLKISCKGSGYNFASDWIGWVRQTPGKGLEWMGVYIPGSDST  
 RYSASFQGVVITISADKSINTAYLQWSSLKASDTAMYYCASAAGIAAAGHVTAFDIWGQ  
 GTMVTVSS (SEQ ID NO: 17)
- Ab2-Последовательность нуклеиновой кислоты вариabельной области тяжелой цепи**  
 GAGGTGCAACTGGTCAATCCGGAGCCGAGATGAAAAAGCCAGGGGAGAGCCTGA  
 AGATCTCTTGTAAAGGGCTCTGGCTATAACTTCGCTAGTGATTGGATCGGATGGGTGA  
 GGCAAAACCCCGAAAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGTGATCTACCCCGGCGACTCC  
 GACACACGCTATAGCGCCTCATTCAGGGCCAGGTCACCATAAGTGCTGATAAATC  
 AATAAATACAGCCTACTTGCAATGGTCAAGTCTGAAAGCCTCAGATACTGCCATGTA  
 CTATTGTGCCTCTGCCGCGGCATTGCCGCGGCGGTCACGTCACCGCCTTCGACAT  
 TTGGGGTCAGGGCACTATGGTCACTGTAAGCTCC (SEQ ID NO: 93)
- Ab2-Аминокислотная последовательность вариabельной области легкой цепи**  
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST  
 RESGVPDFRFSGSGSDFTLTISSLQAEDEVAVYYCQYYSTPVTFGQGTKLEIK (SEQ ID  
 NO: 18)
- Ab2-Последовательность нуклеиновой кислоты вариabельной области легкой цепи**  
 GACATAGTCATGACCCAGTCACCTGACTCTTGGCCGTGTCTCTGGGGGAGAGAGCC  
 ACAATAAATTGCAAGTCATCACAGAGCGTCCTGTACTCCTCCAATAATAAAAAATTAC  
 CTGGCCTGGTACCAGCAAAAGCCCGGCAACCCCAAAATTGTTGATTTACTGGGCT  
 AGTACAAGGGAATCTGGAGTGCCAGACCGGTTTTCTGGTCTGGATCTGGTACTGAC  
 TTCACCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCCGAAGACGTGGCTGTGTACTATTGTACG  
 CAGTACTATAGTACACCAGTTACTTTCGGCCAAGGCACTAAACTCGAAATCAAG  
 (SEQ ID NO: 94)
- Ab2-Аминокислотная последовательность тяжелой цепи**  
 EVQLVQSGAEMKPKGESLKISCKGSGYNFASDWIGWVRQTPGKGLEWMGVYIPGSDST  
 RYSASFQGVVITISADKSINTAYLQWSSLKASDTAMYYCASAAGIAAAGHVTAFDIWGQ  
 GTMVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH  
 TFPVQLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVLDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPA  
 PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK  
 PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVY  
 TLPDSSEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSR  
 LTVDKSRWQEGNVSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 19)
- Ab2-Аминокислотная последовательность легкой цепи**  
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST  
 RESGVPDFRFSGSGSDFTLTISSLQAEDEVAVYYCQYYSTPVTFGQGTKLEIKRTVAAP  
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVTVCLLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 20)
- Ab3-Аминокислотная последовательность вариabельной области тяжелой цепи**  
 EVQLLESGLLVQPGGSLRLSAAASGFTFRNYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGAT  
 YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSSGHWDFDYWGQGLTV  
 TVSS (SEQ ID NO: 95)
- Ab3-Последовательность нуклеиновой кислоты вариabельной области тяжелой цепи**  
 GAGGTTACGCTTCTGGAGAGCGCGGTGGTCTGTACAACCTGGAGGATCACTCAG  
 GTTGTACATGTGCCGAAGCGGTTTACATTCAGGAACCTATGCAATGAGCTGGGTGAG  
 ACAGGCTCCCGCAAGGGACTTGAGTGGGTATCTTCCATCAGCGGATCTGGAGGAG  
 CAACATATTATGCAGATAGTGTCAAAGGCAGGTTCAACAATAAGCCGCGACAATTCT  
 AAAAACTACTCTTATCTTCAAATGAATAGCCTTAGGGCTGAGGATACGGCGGTGTAT  
 TATTGTGCCCGCTCTCAAGCGGCATTGGGACTTCGATTATTGGGGCAGGGTACT  
 CTGGTACTGTTTCTCC (SEQ ID NO: 96)

Ab3-Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи  
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSR  
 FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSAFPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 97)

Ab3-Последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области легкой цепи  
 GACATCCAAATGACACAGAGCCCGCTTCCCTCTCAGCTTCAGTCGGTGATCGAGTG  
 ACGATTACGTGCCGCGCCAGCCAAAGCATCTCCTCCTATCTTAACTGGTATCAGCAG  
 AAACCCGGAAAGGCCCAAGTTGCTTATTACGACGCATCCTCCCTCAATCTGGT  
 GTGCCAGCAGGTTCTCAGGCAGCGGTTTCAGGAACGGATTTACTCTTACCATTCT  
 AGTCTTCAACCTGAGGATTTGCGACGTATTACTGTCAACAGAGCTACAGTGCGCCG  
 TTCACCTTTGGGCAGGTTACTAAGGTTGAGATAAAGC (SEQ ID NO: 98)

Ab3-Аминокислотная последовательность тяжелой цепи  
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGAT  
 YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSSGHWFDFYWGQGLTV  
 TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  
 LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLG  
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
 FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPS  
 QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD  
 KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 99)

Ab3-Аминокислотная последовательность легкой цепи  
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSR  
 FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSAFPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
 QLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTS  
 KADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 100)

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по настоящему раскрытию, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и комплексом LRRC33-TGFβ1, включают в себя любое антитело, которое включает в себя варибельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 13, 17 или 95 или варибельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 14, 18 или 97. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по настоящему раскрытию, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и комплексом LRRC33-TGFβ1, включают в себя любое антитело, которое включает в себя варибельные пары тяжелой цепи и легкой цепи SEQ ID NO: 13 и 14; 17 и 18 и 95 и 97.

Аспекты настоящего раскрытия предоставляют антитела, которые специфично связываются с двумя или более из следующих комплексов: комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и комплекс LRRC33-TGFβ1, содержащих аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи и/или легкой цепи, гомологичную любой из описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, которое специфично связывается с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и комплексом LRRC33-TGFβ1, содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи или последовательность варибельной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 75% (например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 13, 17 или 95 или последовательности варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 14, 18 или 97. Согласно некоторым вариантам осуществления гомологичные аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи и/или легкой цепи не варьируют в пределах любой из последовательностей CDR. Например, согласно некоторым вариантам осуществления степень вариации последовательности (например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) может встречаться в аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи и/или аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи, исключая любую из представленных последовательностей CDR в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по настоящему раскрытию, которые специфично связываются с двумя или более из: комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и комплекса LRRC33-TGFβ1, включают в себя любое антитело или его антиген-связывающую часть, которая включает в себя тяжелую цепь SEQ ID NO: 15 или 19 или легкую цепь SEQ ID NO: 16 или 20. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по настоящему раскрытию, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, включают в себя любое антитело, которое включает в себя пары тяжелой цепи и легкой цепи SEQ ID NO: 15 и 16 или 19 и 20.

Аспекты настоящего раскрытия предоставляют антитела, которые специфично связываются с двумя или более из: комплекса GARP-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP3-TGF $\beta$ 1 и комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1, характеризующегося аминокислотной последовательностью тяжелой цепи и/или легкой цепи, гомологичной любой из описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело, которое специфично связывается с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, содержит последовательность тяжелой цепи или последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 75% (например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 15 или 19 или аминокислотной последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 16 или 20. Согласно некоторым вариантам осуществления гомологичные аминокислотные последовательности тяжелой цепи и/или легкой цепи не варьируют в пределах любой из последовательностей CDR, представленных в настоящем документе. Например, согласно некоторым вариантам осуществления степень вариации последовательности (например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) может встречаться в аминокислотной последовательности тяжелой цепи и/или легкой цепи, исключая любую из последовательностей CDR, представленных в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по настоящему раскрытию, которые специфично связываются с двумя или более из: комплекса GARP-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1, включают в себя любое антитело или его антигенсвязывающую часть, которая включает в себя тяжелую цепь SEQ ID NO: 15 или 19 или легкую цепь SEQ ID NO: 16 или 20. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по настоящему раскрытию, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, включают в себя любое антитело, которое включает в себя пары тяжелой цепи и легкой цепи SEQ ID NO: 15 и 16 или 19 и 20.

Аспекты настоящего раскрытия предоставляют антитела, которые специфично связываются с двумя или более из: комплекса GARP-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1, характеризующегося аминокислотной последовательностью тяжелой цепи и/или легкой цепи, гомологичной любой из описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело, которое специфично связывается с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, содержит последовательность тяжелой цепи или последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 75% (например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 15 или 19 или аминокислотной последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 16 или 20. Согласно некоторым вариантам осуществления гомологичные аминокислотные последовательности тяжелой цепи и/или легкой цепи не варьируют в пределах любой из представленных в настоящем документе последовательностей CDR. Например, согласно некоторым вариантам осуществления степень вариации последовательности (например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) может встречаться в аминокислотной последовательности тяжелой цепи и/или легкой цепи, исключая любую из последовательностей CDR, представленных в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления "процентная идентичность" двух аминокислотных последовательностей определяется с использованием алгоритма Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, модифицированного как в Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215: 403-10, 1990. Поиск белка BLAST может быть выполнен с помощью программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3, чтобы получить аминокислотные последовательности, гомологичные представляющим интерес белковым молекулам. Там, где существуют пропуски между двумя последовательностями, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут использоваться параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

В любом из описанных в настоящем документе антител или антигенсвязывающих фрагментов одна или несколько консервативных мутаций могут быть введены в CDR или каркасные последовательности в положениях, где остатки вряд ли будут вовлечены во взаимодействие антитело-антиген. Согласно некоторым вариантам осуществления такая консервативная мутация(и) может быть введена в CDR или каркасные последовательности в положении(ях), где остатки вряд ли будут вовлечены во взаимодействие с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, как определено на основе кристаллической структуры. Согласно некоторым вариантам осуществления верный интерфейс (например, остатки, участвующие во взаимодействии антиген-антитело) может быть выведен из известной структурной информации о другом антигене, имеющем структурные сходства.

Используемый в настоящем документе термин "консервативная аминокислотная замена" относится к аминокислотной замене, которая не изменяет характеристики относительного заряда или размера белка, в котором

производится аминокислотная замена. Варианты могут быть получены в соответствии со способами изменения полипептидной последовательности, известными специалисту в настоящей области техники, такими как находящиеся в ссылках, которые составляют такие способы, например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 или *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот включают в себя замены, выполненные среди аминокислот в следующих группах: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N и (g) E, D.

Согласно некоторым вариантам осуществления представленные в настоящем документе антитела содержат мутации, которые придают антителам желательные свойства. Например, чтобы избежать потенциальных осложнений из-за обмена Fab-плечом, который, как известно, происходит с нативными моноклональными антителами IgG4, представленные в этом документе антитела могут содержать стабилизирующую мутацию "Adair" (Angal et al., "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody," *Mol Immunol* 30, 105-108; 1993), где серин 228 (нумерация по EU; нумерация по Kabat остатка 241) превращается в пролин, что приводит к IgG1-подобной (CPPCP (SEQ ID) №: 54)) шарнирной последовательности. Соответственно, любое из антител может включать в себя стабилизирующую мутацию "Adair" или аминокислотную последовательность CPPCP (SEQ ID NO: 54).

Специфичные к изоформе, перmissive по отношению к контексту ингибиторы (которые включают в себя независимые от контекста ингибиторы) TGFβ1 по настоящему раскрытию, например, антитела, которые специфично связываются с двумя или более из: комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и комплекса LRRC33-TGFβ1, могут необязательно содержать константные области антитела или их части. Например, домен VL может быть присоединен на своем C-конце к константному домену легкой цепи, подобному Cκ или Cλ. Аналогично, домен VH или его часть может быть присоединен ко всей или части тяжелой цепи, такой как IgA, IgD, IgE, IgG и IgM и к любому подклассу изотипа. Антитела могут включать в себя подходящие константные области (смотрите, например, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991)). Следовательно, антитела в объеме настоящего раскрытия могут включать в себя домены VH и VL или их антигенсвязывающую часть в сочетании с любыми подходящими константными областями.

Дополнительно или альтернативно, такие антитела могут включать в себя или не включать в себя каркасную область антител SEQ ID NO: 13-20. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, представляют собой мышинные антитела и включают в себя мышинные последовательности каркасной области.

Согласно некоторым вариантам осуществления такие антитела связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1 с относительно высокой аффинностью, например, с KD менее чем  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M или ниже. Например, такие антитела могут связываться с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1 с аффинностью от 5 пМ до 500 нМ, например, от 50 пМ до 100 нМ, например, от 500 пМ до 50 нМ. Настоящее раскрытие также включает в себя антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с любым из описанных в настоящем документе антител за связывание с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1 и которые характеризуются аффинностью 50 нМ или ниже (например, 20 нМ или ниже, 10 нМ или ниже, 500 пМ или ниже, 50 пМ или ниже или 5 пМ или ниже). Кинетику аффинности и связывания антител, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, можно исследовать с использованием любого подходящего способа, включая в себя, без ограничения, биосенсорную технологию (например, OSET или BIACORE).

Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы связанного с клетками TGFβ1 (например, презентуемого GARP TGFβ1 и презентуемого LRRC33 TGFβ1) по настоящему изобретению включают в себя антитела или их фрагменты, которые специфично связываются с таким комплексом (например, GARP-про/латентный TGFβ1 и LRRC33-про/латентный TGFβ1) и запускают интернализацию комплекса. Этот способ действия вызывает удаление или истощение неактивных комплексов TGFβ1 с клеточной поверхности (например, Treg, макрофаги и т.д.), следовательно, уменьшение TGFβ1, доступного для активации. Согласно некоторым вариантам осуществления такие антитела или их фрагменты связывают целевой комплекс зависимым от pH образом, так что связывание происходит при нейтральном или физиологическом pH, но антитело диссоциирует от своего антигена при кислом pH. Такие антитела или их фрагменты могут функционировать в качестве рециркулирующих антител.

Полипептиды.

Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к полипептиду, характеризующемуся последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 95,

SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 19. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид представляет собой переменный домен тяжелой цепи или домен тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид по меньшей мере на 75% (например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичен любой из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 19.

Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к полипептиду, характеризующемуся последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид представляет собой переменный домен легкой цепи или домен легкой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид по меньшей мере на 75% (например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичен любой из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 20.

Антитела, конкурирующие со специфичными к изоформе, пермиссивными по отношению к контексту ингибирующими антителами к TGFβ1

Аспекты настоящего раскрытия относятся к антителам, которые конкурируют или перекрестно конкурируют с любым из представленных в настоящем документе антител. Используемый в настоящем документе термин "конкурировать" в отношении антитела означает, что первое антитело связывается с эпитопом (например, эпитопом комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и/или комплекса LRRC33-TGFβ1), достаточно сходным со связыванием второго антитела образом, так что результат связывания первого антитела с его эпитопом заметно снижается в присутствии второго антитела по сравнению со связыванием первого антитела в отсутствие второго антитела. Альтернативно, связывание второго антитела с его эпитопом также заметно снижается в присутствии первого антитела, может, но не обязательно, иметь место. То есть первое антитело может ингибировать связывание второго антитела с его эпитопом без того, чтобы это второе антитело ингибировало связывание первого антитела с его соответствующим эпитопом. Однако в тех случаях, когда каждое антитело обнаруживаемо ингибирует связывание другого антитела с его эпитопом или лигандом, в той же, большей или меньшей степени антитела считаются "перекрестно конкурирующими" друг с другом за связывание их соответствующего эпитопа(ов). Как конкурирующие, так и перекрестно конкурирующие антитела входят в объем настоящего раскрытия. Независимо от механизма, посредством которого происходит такая конкуренция или перекрестная конкуренция (например, стерическое затруднение, конформационное изменение или связывание с общим эпитопом или его частью), специалист в настоящей области техники поймет, что такие конкурирующие и/или перекрестно конкурирующие антитела охватываются и могут быть применимы для представленных в настоящем документе способов и/или композиций.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к антителам, которые конкурируют или перекрестно конкурируют с любым из специфичных антител или их антигенсвязывающими частями, как предусмотрено в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с тем же эпитопом или около него, что и любое из представленных в настоящем документе антител. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть связывается около эпитопа, если оно связывается в пределах 15 аминокислотных остатков эпитопа или менее. Согласно некоторым вариантам осуществления любое антитело или его антигенсвязывающая часть, как предусмотрено в настоящем документе, связывается в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных остатков эпитопа, который связан с любым из представленных в настоящем документе антител.

Согласно другому варианту осуществления в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающая часть, конкурирующая или перекрестно конкурирующая за связывание с любым из представленных в настоящем документе антигенов (например, комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1) с равновесной константой диссоциации, KD, между антителом и белком менее чем  $10^{-6}$  М. Согласно другим вариантам осуществления антитело конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание с любым из представленных в настоящем документе антигенов с KD в диапазоне от  $10^{-11}$  М до  $10^{-6}$  М. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлено антитело к TGFβ1 или его антигенсвязывающая часть, которая конкурирует за связывание с описанным в настоящем документе антителом или его антигенсвязывающей частью. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлено антитело к TGFβ1 или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с тем же эпитопом, что и описанное в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть.

Любое из представленных в настоящем документе антител может быть охарактеризовано с использованием любых подходящих способов. Например, один из способов заключается в идентификации эпитопа, с которым связывается антиген, или "картирование эпитопа". Существует много подходящих способов картирования и характеристики расположения эпитопов на белках, включая в себя определение

кристаллической структуры комплекса антитело-антиген, анализы конкуренции, анализы экспрессии фрагментов генов и анализы на основе синтетических пептидов, как описано, например, в главе 11 Harlow and Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. В дополнительном примере картирование эпитопов может быть использовано для определения последовательности, с которой связывается антитело. Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп, т.е. содержащийся в одном отрезке аминокислот, или конформационный эпитоп, образованный трехмерным взаимодействием аминокислот, которое необязательно может содержаться в одном отрезке (линейная последовательность первичной структуры). Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп представляет собой эпитоп TGF $\beta$ 1, который доступен только для связывания описанным в настоящем документе антителом или его антигенсвязывающей частью, когда TGF $\beta$ 1 находится в комплексе GARP-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексе LRRC33-TGF $\beta$ 1. Пептиды различной длины (например, длиной по меньшей мере 4-6 аминокислот) могут быть выделены или синтезированы (например, рекомбинантно) и использованы для анализов связывания с антителом. В другом примере эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен в систематическом скрининге с использованием перекрывающихся пептидов, полученных из последовательности антигена-мишени, и определения связывания антителом. В соответствии с анализами экспрессии фрагментов гена открытая рамка считывания, кодирующая антиген-мишень, фрагментируется либо случайным образом, либо с помощью специфичных генетических конструкций, и определяется реакционная способность экспрессированных фрагментов антигена с антителом, подлежащим исследованию. Фрагменты гена могут, например, быть получены с помощью ПНР, а затем транскрибированы и транслированы в белок *in vitro* в присутствии радиоактивных аминокислот. Связывание антитела с радиоактивно меченными фрагментами антигена затем определяют с помощью иммунопреципитации и гелеэлектрофореза. Определенные эпитопы также могут быть идентифицированы с использованием больших библиотек случайных пептидных последовательностей, отображаемых на поверхности фаговых частиц (фаговые библиотеки). Альтернативно, определенная библиотека перекрывающихся пептидных фрагментов может быть исследована на связывание с исследуемым антителом в простых анализах связывания. В дополнительном примере мутагенез антигенсвязывающего домена, эксперименты по замене доменов и сканирующий аланином мутагенез могут быть выполнены для идентификации остатков, требуемых, достаточных и/или необходимых для связывания эпитопа. Например, эксперименты по перестановке доменов могут быть выполнены с использованием мутанта антигена-мишени, в котором были заменены (обменены) различные фрагменты комплекса GARP-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1 с последовательностями из близкородственного, но антигенно отличного белка, такого как другой представитель семейства белков TGF (например, GDF11). Путем оценки связывания антитела с мутантом комплекса GARP-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1 можно оценить важность конкретного фрагмента антигена для связывания антитела.

Альтернативно, конкурентные анализы могут быть выполнены с использованием других антител, про которые известно, что они связываются с тем же антигеном, чтобы определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и другие антитела. Конкурентные анализы хорошо известны специалистам в настоящей области техники.

Кроме того, может быть определено взаимодействие любого из представленных в настоящем документе антител с одним или несколькими остатками в комплексе GARP-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексе LRRC33-TGF $\beta$ 1 с помощью рутинной технологии. Например, можно определить кристаллическую структуру и может быть определено расстояния между остатками в комплексе GARP-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексе LRRC33-TGF $\beta$ 1 и одним или несколькими остатками в антителе, соответственно. На основе такого расстояния можно определить, взаимодействует ли конкретный остаток в комплексе GARP-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексе LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексе LRRC33-TGF $\beta$ 1 с одним или несколькими остатками в антителе. Кроме того, для определения преимущественного связывания потенциального антитела можно применять подходящие способы, такие как конкурентные анализы и анализы целевого мутагенеза.

Различные модификации и вариации антител.

Неограничивающие вариации, модификации и признаки любого из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, охватываемых настоящим раскрытием, кратко обсуждаются ниже. Варианты осуществления соответствующих аналитических способов также предоставляются.

Структурные единицы встречающегося в природе антитела, как правило, включают в себя тетрамер. Каждый такой тетрамер, как правило, состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара содержит одну полноразмерную "легкую" (согласно некоторым вариантам осуществления, приблизительно 25 кДа) и одну полноразмерную "тяжелую" цепь (согласно некоторым вариантам осуществления, приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи, как правило, включает в себя вариабельную область приблизительно от 100 до 110 или более аминокислот, которая, как правило, отвеча-

ет за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи, как правило, определяет константную область, которая может отвечать за эффекторную функцию. Легкие цепи антитела человека, как правило, классифицируют как легкие цепи каппа и лямбда. Тяжелые цепи, как правило, классифицируются как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон и определяют изотип антитела. Антитело может быть любого типа (например, IgM, IgD, IgG, IgA, IgY и IgE) и класса (например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgM<sub>1</sub>, IgM<sub>2</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub>). Внутри полноразмерных легкой и тяжелой цепей, как правило, переменные и константные области соединены областью "J" из приблизительно 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также содержит область "D" из еще приблизительно 10 аминокислот (смотрите, например, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (полностью включена посредством ссылки)). Переменные области каждой пары легкая/тяжелая цепь, как правило, образуют сайт связывания антигена.

Переменные области, как правило, характеризуются одинаковой общей структурой относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гиперпеременными областями, также называемыми определяющими комплементарности областями или CDR. CDR из двух цепей каждой пары, как правило, выровнены по каркасным областям, которые могут обеспечить связывание со специфичным эпитопом. От N-конца к C-концу переменные области как легкой, так и тяжелой цепи, как правило, содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Распределение аминокислот по каждому домену, как правило, соответствует определениям Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)) или Chothia & Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Chothia et al. (1989) *Nature* 342: 878-883. CDR легкой цепи также могут упоминаться как CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, а CDR тяжелой цепи также могут упоминаться как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело может содержать небольшое количество делеций аминокислот с карбокси-конца тяжелой(ых) цепи(ей). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит тяжелую цепь, имеющую 1-5 аминокислотных делеций на карбокси-конце тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления определенное разграничение CDR и идентификация остатков, содержащих сайт связывания антитела, достигается путем определения структуры антитела и/или определения структуры комплекса антитело-лиганд. Согласно определенным вариантам осуществления это может быть выполнено любым из множества способов, известных специалистам в настоящей области техники, таких как рентгеновская кристаллография. Согласно некоторым вариантам осуществления различные способы анализа могут использоваться для идентификации или аппроксимации областей CDR. Примеры таких способов включают в себя, без ограничения, определение Kabat, определение Chothia, определение AbM и определение контакта.

Антитело с "созревшей аффинностью" представляет собой антитело с одним или несколькими изменениями в одной или нескольких его CDR, которые приводят к улучшению аффинности антитела к антигену по сравнению с исходным антителом, которое не обладает этими изменениями. Иллюстративные антитела с созревшей аффинностью будут характеризоваться наномолярной или даже пикомолярной аффинностью к антигену-мишени. Антитела с созревшей аффинностью получают способами, известными в настоящей области техники. Marks et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 779-783 описывает созревание аффинности путем перетасовки доменов VH и VL. Случайный мутагенез остатков CDR и/или каркаса описан в публикациях Varbas, et al. (1994) *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813; Schier et al. (1995) *Gene* 169: 147-155; Yelton et al., (1995) *J. Immunol.* 155: 1994-2004; Jackson et al. (1995) *J. Immunol.* 154(7): 3310-9 и Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 226: 889-896, и селективная мутация в положениях селективного мутагенеза, положениях контакта или гипермутации с повышающим активностью аминокислотным остатком описана в патенте США № 6914128.

Термин "привитое CDR антитело" относится к антителам, которые содержат последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи из одного вида, но в которых последовательности одной или нескольких областей CDR в VH и/или VL заменены последовательностями CDR другого вида, такие как антитела, имеющие мышинные переменные области тяжелой и легкой цепи, в которых одна или несколько мышинных CDR (например, CDR3) были заменены человеческими последовательностями CDR.

Термин "химерное антитело" относится к антителам, которые содержат последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи одного вида и последовательности константной области другого вида, такие как антитела, имеющие переменные области тяжелой и легкой цепи мыши, связанные с константными областями человека.

Используемый в настоящем документе термин "каркас" или "каркасная последовательность" относится к остальным последовательностям переменной области минус CDR. Поскольку точное определение последовательности CDR может быть определено различными системами, значение каркасной последовательности подлежит соответственно различным интерпретациям. Шесть CDR (CDR-L1, -L2 и -L3 легкой цепи и CDR-H1, -H2 и -H3 тяжелой цепи) также делят каркасные области легкой цепи и тяжелой цепи на четыре подобласти (FR1, FR2, FR3 и FR4) в каждой цепи, в которой CDR1 расположена между FR1 и FR2, CDR2 между FR2 и FR3 и CDR3 между FR3 и FR4. Без указания конкретных подобластей, таких как FR1, FR2, FR3 или FR4, каркасная область, на которую ссылаются другие, представляет собой комбинированные FR в переменной области одной встречающейся в природе цепи иммуноглобулина.

Как используется в настоящем документе, FR представляет собой одну из четырех подобластей, а FR представляет две или более из четырех подобластей, составляющих каркасную область.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержат константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина константного домена IgM человека, константного домена IgG человека, константного домена IgG1 человека, константного домена IgG2 человека, константного домена IgG2A человека, константного домена IgG2B человека, константного домена IgG2 человека, константного домена IgG3 человека, константного домена IgG3 человека, константного домена IgG4 человека, константного домена IgA человека, константного домена IgA1 человека, константного домена IgA2 человека, константного домена IgD человека или константного домена IgE человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержат константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина константного домена IgG1 человека или константного домена IgG4 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина константного домена IgG4 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина константного домена IgG4 человека, содержащего замену основной цепи Ser на Pro, который образует шарнир, подобный IgG1, и позволяет образовывать межцепочечные дисульфидные связи.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть дополнительно содержит константный домен иммуноглобулина легкой цепи, содержащий константный домен лямбда Ig человека или константный домен каппа Ig человека.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой IgG, содержащий четыре полипептидные цепи, которые представляют собой две тяжелые цепи и две легкие цепи.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой гуманизованное антитело, диатело или химерное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой гуманизованное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой антитело человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит каркас, характеризующийся аминокислотной последовательностью зародышевой линии человека.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающая часть представляет собой Fab-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, scFab-фрагмент или scFv-фрагмент.

Используемый в настоящем документе термин "ген антитела зародышевой линии" или "фрагмент гена" относится к последовательности иммуноглобулина, кодируемой нелимфоидными клетками, которые не подверглись процессу созревания, который приводит к генетической перестройке и мутации для экспрессии конкретного иммуноглобулина (смотрите, например, Shapiro et al. (2002) Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200; Marchalonis et al. (2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484: 13-30). Одно из преимуществ, обеспечиваемых различными вариантами осуществления настоящего раскрытия, связано с распознаванием того, что гены антител зародышевой линии более вероятно, чем гены зрелых антител, сохраняют структуры незаменимых аминокислотных последовательностей, характерных для особей данного вида, и, следовательно, с меньшей вероятностью распознаются как чужеродный источник при терапевтическом применении у этого вида.

Используемый в настоящем документе термин "нейтрализующий" относится к противодействию биологической активности антигена, когда связывающий белок специфично связывается с антигеном. Согласно одному варианту осуществления нейтрализующий связывающий белок связывается с антигеном/мишенью, например, цитокином, киназой, фактором роста, белком клеточной поверхности, растворимым белком, фосфатазой или рецепторным лигандом, и снижает его биологическую активность по меньшей мере приблизительно на 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше.

Используемый в настоящем документе термин "связывающий белок" включает в себя любой полипептид, который специфично связывается с антигеном (например, TGFβ1), включая в себя, без ограничения, антитело или его антигенсвязывающие части, DVD-IgTM, TVD-Ig, RAb-Ig, биспецифическое антитело и двойное специфическое антитело.

Термин "моноклональное антитело" или "mAb" при использовании в контексте содержащей его композиции может относиться к препарату антител, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены против одного антигена. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, включают в себя разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Модификатор "моноклональный" не следует истолковывать как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом.

Используемый в настоящем документе термин "рекомбинантное человеческое антитело" предназначен для включения всех человеческих антител, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, таких как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описано дополнительно в разделе

ПС ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека (Hoogenboom, H.R. (1997) *TIB Tech.* 15: 62-70; Azzazy, H. and Highsmith, W.E. (2002) *Clin. Biochem.* 35: 425-445; Gavilondo, J.V. and Larrick, J.W. (2002) *BioTechniques* 29: 128-145; Hoogenboom, H. and Chames, P. (2000) *Immunol. Today* 21: 371-378, включенные в настоящий документ посредством ссылки), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным для генов иммуноглобулина человека (смотрите Taylor, L. D. et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20: 6287-6295; Kellermann, S-A. and Green, L.L. (2002) *Cur. Opin. in Biotechnol.* 13: 593-597; Little, M. et al. (2000) *Immunol. Today* 21: 364-370) или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который предусматривает сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако, согласно некоторым вариантам осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, когда используется трансгенное для человеческих последовательностей Ig животной, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, следовательно, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантного антитела представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей VH и VL зародышевой линии человека и связаны с ними, в природных условиях не могут существовать в репертуаре зародышевой линии человеческого антитела *in vivo*.

Используемый в настоящем документе термин "иммуноглобулин с двумя переменными доменами" или "DVD-IgTM" и т.п. включает в себя связывающие белки, содержащие спаренный полипептид DVD тяжелой цепи и полипептид DVD легкой цепи, причем каждая спаренная тяжелая и легкая цепь обеспечивают два сайта связывания антигена. Каждый сайт связывания включает в себя в общей сложности 6 CDR, участвующих в связывании антигена, на каждый сайт связывания антигена. DVD-IgTM, как правило, содержит два плеча, связанных друг с другом, по меньшей мере частично, путем димеризации доменов CH3, причем каждое плечо DVD является биспецифическим, обеспечивая иммуноглобулин с четырьмя сайтами связывания. DVD-IgTM представлены в патентных публикациях США № 2010/0260668 и 2009/0304693, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки, включая в себя перечни последовательностей.

Используемый в настоящем документе термин "иммуноглобулин с тройным переменным доменом" или "TVD-Ig" и т.п. представляет собой связывающие белки, содержащие спаренный полипептид связывающего белка TVD с тяжелой цепью и полипептид связывающего белка TVD с легкой цепью, причем каждая спаренная тяжелая и легкая цепь обеспечивают три сайта связывания антигена. Каждый сайт связывания включает в себя в общей сложности 6 CDR, участвующих в связывании антигена на каждый сайт связывания антигена. Связывающий белок TVD может иметь два плеча, связанных друг с другом по меньшей мере частично путем димеризации доменов CH3, причем каждое плечо связывающего белка TVD является триспецифическим, обеспечивая связывающий белок с шестью сайтами связывания.

Используемый в настоящем документе термин "иммуноглобулин рецептор-антитело" или "RAb-Ig" и т.п. представляет собой связывающие белки, содержащие полипептид RAb с тяжелой цепью и полипептид RAb с легкой цепью, которые вместе образуют три сайта связывания антигена. Один антигенсвязывающий сайт образуется путем спаривания переменных доменов тяжелых и легких цепей антител, присутствующих в каждом из полипептида RAb с тяжелой цепью и полипептида RAb с легкой цепью, с образованием единого сайта связывания с общим количеством 6 CDR, обеспечивающих первый сайт связывания антигена. Каждый полипептид RAb с тяжелой цепью и полипептид RAb с легкой цепью включает в себя последовательность рецептора, которая независимо связывает лиганд, обеспечивающий второй и третий сайты связывания "антигена". RAb-Ig, как правило, содержит два плеча, связанных друг с другом, по меньшей мере частично, димеризацией доменов CH3, причем каждое плечо RAb-Ig является триспецифическим, обеспечивая иммуноглобулин с шестью сайтами связывания. RAb-Ig описаны в публикации заявки на патент США № 2002/0127231, полное содержание которой, включая в себя перечни последовательностей, включено в настоящий документ посредством ссылки.

Термин "биспецифическое антитело", используемый в настоящем документе и отличающийся от "биспецифического белка, связывающего половину Ig" или "биспецифического связывающего белка (половины Ig)", относится к полноразмерным антителам, которые производятся технологией квадрогибридомы (смотрите Milstein, C. and Cuello, A.C. (1983) *Nature* 305(5934): p. 537-540), путем химического конъюгирования двух разных моноклональных антител (смотрите Staerz, U.D. et al. (1985) *Nature* 314(6012): 628-631) или с помощью способа "выступ-во-впадину" или аналогичных подходов, которые вводят мутации в области Fc, которые не ингибируют димеризацию CH3-CH3 (смотрите Holliger, P. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90(14): 6444-6448), что приводит к множеству различных видов иммуноглобулинов, из которых только один является функциональным биспецифическим антителом. По молекулярной функции биспецифическое антитело связывает один антиген (или эпитоп) на одном из двух своих связывающих плечей (одна пара HC/LC) и связывает другой антиген (или эпитоп) на своем втором плече (другая пара HC/LC). Согласно этому определению, биспецифическое антитело содержит два раз-

ных антигенсвязывающих плеча (как по специфичности, так и по последовательностям CDR) и является одновалентным для каждого антигена, с которым оно связывается.

Термин "двойное специфическое антитело", используемый в настоящем документе и отличающийся от биспецифического белка, связывающего половину Ig, или биспецифического связывающего белка, относится к полноразмерным антителам, которые могут связывать два разных антигена (или эпитопа) в каждом из своих двух связывающих плечей (пара HC/LC) (смотрите публикацию PCT № WO 02/02773). Соответственно, связывающий белок с двойной специфичностью содержит два идентичных антигенсвязывающих плеча с одинаковой специфичностью и идентичными последовательностями CDR и является двухвалентным для каждого антигена, с которым он связывается.

Используемый в настоящем документе термин "Kon" предназначен для обозначения константы скорости для ассоциации связывающего белка (например, антитела) с антигеном с образованием, например, комплекса антитело/антиген, как известно в настоящей области техники. Термин "Kon" также известен под терминами "константа скорости ассоциации" или "ka", которые используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Это значение указывает на скорость связывания антитела с его антигенномышенью или скорость образования комплекса между антителом и антигеном, также представленную уравнением: антитело ("Ab") + антиген ("Ag") → Ab-Ag.

Используемый в настоящем документе термин "Koff" предназначен для обозначения константы скорости диссоциации связывающего белка (например, антитела), например, из комплекса антитело/антиген, как известно в настоящей области техники. "Koff" также известна под терминами "константа скорости диссоциации" или "kd", которые используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Это значение указывает на скорость диссоциации антитела от его целевого антигена или разделения комплекса Ab-Ag со временем на свободное антитело и антиген, как показано уравнением: Ab + Ag ← Ab-Ag.

Термины "равновесная константа диссоциации" или "KD", используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к значению, полученному при измерении титрования в равновесном состоянии, или путем деления константы скорости диссоциации (koff) на константу скорости ассоциации (kon). Константа скорости ассоциации, константа скорости диссоциации и равновесная константа диссоциации используются для представления аффинности связывания связывающего белка, например, антитела, с антигеном. Способы определения констант скорости ассоциации и диссоциации хорошо известны в настоящей области техники. Использование способов на основе флуоресценции обеспечивает высокую чувствительность и возможность исследовать образцы в физиологических буферах в состоянии равновесия. Можно использовать другие экспериментальные подходы и инструменты, такие как анализ VIAcore® (анализ биомолекулярного взаимодействия) (например, прибор, доступный от VIAcore International AB, компании GE Healthcare, Упсала, Швеция). Кроме того, также можно использовать анализ KinExA® (Kinetic Exclusion Assay), доступный от Sapidyne Instruments (Бойсе, Айдахо).

Используемые в настоящем документе термины "кристаллический" и "кристаллизованный" относятся к связывающему белку (например, антителу) или его антигенсвязывающей части, который существует в форме кристалла. Кристаллы представляют собой одну форму твердого состояния вещества, которая отличается от других форм, таких как аморфное твердое состояние или жидкокристаллическое состояние. Кристаллы состоят из регулярных, повторяющихся трехмерных массивов атомов, ионов, молекул (например, белков, таких как антитела) или молекулярных сборок (например, комплексов антиген/антитело). Эти трехмерные массивы расположены в соответствии с конкретными математическими соотношениями, которые хорошо понятны в настоящей области техники. Основная единица, или строительный блок, который повторяется в кристалле, называется асимметричной единицей. Повторение асимметричной единицы в расположении, которое соответствует заданной, четко определенной кристаллографической симметрии, обеспечивает "элементарное звено" кристалла. Повторение элементарного звена регулярными трансляциями во всех трех измерениях дает кристалл. Смотрите Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2nd ed., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999). Термин "линкер" используется для обозначения полипептидов, содержащих два или более аминокислотных остатка, соединенных пептидными связями, и используется для связывания одной или нескольких антигенсвязывающих частей. Такие линкерные полипептиды хорошо известны в настоящей области техники (смотрите, например, Holliger, P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R.J. et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Иллюстративные линкеры включают в себя, без ограничения, ASTKGPSVFLPLAP (SEQ ID NO: 55), ASTKGP (SEQ ID NO: 56); TVAAPSVFLFPP (SEQ ID NO: 57); TVAAP (SEQ ID NO: 58); AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 59); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 60); AKTTPKLG (SEQ ID NO: 61); SAKTTPKLG (SEQ ID NO: 62); SAKTTP (SEQ ID NO: 63); RADAAP (SEQ ID NO: 64); RADAAPTVS (SEQ ID NO: 65); RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 66); RADAAA(G4S)4 (SEQ ID NO: 67); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 68); ADAAP (SEQ ID NO: 69); ADAAPTVSLFPP (SEQ ID NO: 70); QPKAAP (SEQ ID NO: 71); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 72); AKTTP (SEQ ID NO: 73); AKTTPPSVTLPLAP (SEQ ID NO: 74); AKTTAP (SEQ ID NO: 75); AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 76); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:

77); GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 78); GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 79); GHEAAAVM-QVQYPAS (SEQ ID NO: 80); TVAAPSVFLFPPTVAAPSVFLFPP (SEQ NO NO: 81) и ASTKGPSVFPLA-PASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 82).

"Метка" и "обнаруживаемая метка" или "обнаруживаемый фрагмент" означают фрагмент, присоединенный к специфичному связывающему партнеру, такому как антитело или анализ, например, для того, чтобы сделать реакцию между представителями конкретной пары связывания, такой как антитело и анализ, обнаруживаемой, и специфично связывающийся партнер, например, антитело или анализ, помеченные таким образом, обозначаются как "обнаруживаемые меченные". Таким образом, используемый в настоящем документе термин "меченый связывающий белок" относится к белку с включенной меткой, которая обеспечивает идентификацию связывающего белка. Согласно одному варианту осуществления метка представляет собой обнаруживаемый маркер, который может производить сигнал, который можно обнаружить с помощью визуальных или инструментальных средств, например, включения радиоактивно меченной аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинильных фрагментов, которые могут быть обнаружены с помощью маркированного авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которая может быть обнаружена оптическими или колориметрическими способами). Примеры меток для полипептидов включают в себя, без ограничения, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$  и  $^{153}\text{Sm}$ ); хромогены; флуоресцентные метки (например, FITC, родамин и люминофоры на основе комплексов лантанидов); ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, люцифераза и щелочная фосфатаза); хемилюминесцентные маркеры; биотинильные группы; заранее определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пар лейциновой молнии, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания металлов и метки эпитопов) и магнитные средства, такие как хелаты гадолия. Репрезентативные примеры меток, как правило, используемых для иммуноанализов, включают в себя фрагменты, которые производят свет, например, соединения акридиния, и фрагменты, которые производят флуоресценцию, например, флуоресцеин. Другие метки описаны в настоящем документе. В связи с этим сам фрагмент может быть не обнаруживаемо помечен, но может стать обнаруживаемым при реакции с еще одним фрагментом. Использование "обнаруживаемой маркировки" предназначено для охвата последнего типа обнаруживаемого мечения.

Согласно некоторым вариантам осуществления аффинность связывания антитела или его антигенсвязывающей части с антигеном (например, белковым комплексом), таким как комплекс GARP-TGF $\beta$ 1, комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1 определяют с использованием анализа Octet. Согласно некоторым вариантам осуществления анализ Octet представляет собой анализ, который определяет один или несколько кинетических параметров, указывающих на связывание между антителом и антигеном. Согласно некоторым вариантам осуществления система Octet® (ForteBio, Menlo Park, CA) используется для определения аффинности связывания антитела или его антигенсвязывающей части с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1. Например, аффинность связывания антител может быть определена с использованием системы для анализа без меток тест-полосок forteBio Octet QKe, использующей биослойную интерферометрию. Согласно некоторым вариантам осуществления антигены иммобилизованы в биосенсорах (например, покрытых стрептавидином биосенсорах), а антитела и комплексы (например, биотинилированные комплексы GARP-TGF $\beta$ 1 и биотинилированные комплексы LTBP-TGF $\beta$ 1) представлены в растворе в высокой концентрации (50 мкг/мл) для измерения связывающих взаимодействий. Согласно некоторым вариантам осуществления аффинность связывания антитела или его антигенсвязывающей части с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1 определяют с использованием изложенного в табл. 6 протокола. Используемый в настоящем документе термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать биспецифические взаимодействия в реальном времени путем обнаружения изменений концентраций белка в матрице биосенсора, например, с использованием системы BIAcore® (BIAcore International AB, компания GE Healthcare, Упсала, Швеция и Пискатауэй, Нью-Джерси). Для дополнительных описаний смотрите Jonsson, U. et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26; Jonsson, U. et al. (1991) *Biotechniques* 11: 620-627; Johnsson, B. et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125-131 и Johnson, B. et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277.

Идентификация и получение/производство специфичных к изоформе пермиссивных по отношению к контексту ингибиторов TGF $\beta$ 1

Настоящее изобретение охватывает способы скрининга, способы получения и процессы производства антител или их фрагментов, которые связывают два или более из: комплекса GARP-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1, и фармацевтические композиции и содержащие их родственные наборы.

Многочисленные способы могут быть использованы для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению. Например, антитела могут быть получены с использованием способов рекомбинантной ДНК. Моноклональные антитела также могут быть получены путем

производства гибридом (смотрите, например, Kohler and Milstein (1975) *Nature*, 256: 495-499) в соответствии с известными способами. Образующиеся таким образом гибридомы затем подвергают скринингу с использованием стандартных способов, таких как иммуноферментный анализ (ИФА) и анализ поверхностного плазмонного резонанса (например, ОСТЕТ или BIACORE), для идентификации одной или нескольких гибридом, которые производят антитело, которое специфично связывается с указанным антигеном. Любая форма указанного антигена может быть использована в качестве иммуногена, например, рекомбинантного антигена, встречающиеся в природе формы, любые его варианты или фрагменты, а также их антигенный пептид (например, любой из описанных в настоящем документе эпитопов в виде линейного эпитопа или внутри каркаса как конформационный эпитоп). Один иллюстративный способ производства антител предусматривает скрининг библиотек экспрессии белков, которые экспрессируют антитела или их фрагменты (например, scFv), например, библиотеки фагового или рибосомного дисплея. Фаговый дисплей описан, например, в Ladner et al., патенте США № 5223409; Smith (1985) *Science* 228:1315-1317; Clackson et al. (1991) *Nature*, 352: 624-628; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690 и WO 90/02809.

В дополнение к использованию библиотек дисплея, указанный антиген (например, комплекс GARP-TGF $\beta$ 1, комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1) можно использовать для иммунизации отличного от человека хозяина, например, кролика, морской свинки, крысы, мыши, хомяка, овцы, козы, курицы, верблюда, а также отличных от млекопитающих хозяев, таких как акула. Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное представляет собой мышшь.

Согласно другому варианту осуществления моноклональное антитело получают от отличного от человека животного и затем модифицируют, например, химерным способом, используя подходящие способы рекомбинантной ДНК. Были описаны различные подходы для получения химерных антител. Смотрите, например, Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851, 1985; Takeda et al., *Nature* 314:452, 1985; Cabilly et al., патент США № 4816567; Boss et al., патент США. № 4816397; Tanaguchi et al., публикация Европейского патента 171496; публикация Европейского патента 0173494, Патент Великобритании GB 2177096B.

Дополнительные способы получения антител смотрите в *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Настоящее раскрытие не обязательно ограничено каким-либо конкретным источником, способом получения или другими специальными характеристиками антитела.

Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к клеткам-хозяевам, трансформированным полинуклеотидом или вектором. Клетки-хозяева могут представлять собой прокариотические или эукариотические клетки. Полинуклеотид или вектор, который присутствует в клетке-хозяине, может быть либо интегрирован в геном клетки-хозяина, либо он может поддерживаться внехромосомно. Клетка-хозяин может представлять собой любую прокариотическую или эукариотическую клетку, такую как клетка бактерии, насекомого, гриба, растения, животного или человека. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки грибов представляют собой, например, клетки рода *Saccharomyces*, в частности клетки вида *S. cerevisiae*. Термин "прокариотический" включает в себя все бактерии, которые могут быть трансформированы или трансфицированы молекулами ДНК или РНК для экспрессии антитела или соответствующих цепей иммуноглобулина. Прокариотические хозяева могут включать в себя грамотрицательные, а также грамположительные бактерии, такие как, например, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* и *Bacillus subtilis*. Термин "эукариотический" включает в себя дрожжи, высшие растения, клетки насекомых и позвоночных, например, клетки млекопитающих, такие как клетки NSO и CHO. В зависимости от хозяина, используемого в процедуре рекомбинантного получения, антитела или цепи иммуноглобулина, кодируемые полинуклеотидом, могут быть гликозилированы или могут быть негликозилированными. Антитела или соответствующие иммуноглобулиновые цепи могут также включать в себя исходный аминокислотный остаток метионина.

Согласно некоторым вариантам осуществления, после того как вектор был включен в подходящего хозяина, хозяин может поддерживаться в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей и, по желанию, может следовать сбор и очистка легких цепей, тяжелых цепей, димеров иммуноглобулина легкой/тяжелой цепи или интактных антител, антигенсвязывающих фрагментов или других форм иммуноглобулина; смотрите Beuchok, *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, N.Y., (1979). Таким образом, полинуклеотиды или векторы вводятся в клетки, которые, в свою очередь, производят антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, трансгенные животные, предпочтительно млекопитающие, содержащие вышеуказанные клетки-хозяева, могут быть использованы для крупномасштабного производства антитела или фрагментов антитела.

Трансформированные клетки-хозяева можно выращивать в ферментерах и культивировать с использованием любых подходящих способов для достижения оптимального роста клеток. После экспрессии целые антитела, их димеры, отдельные легкие и тяжелые цепи, другие формы иммуноглобулина или антигенсвязывающие фрагменты могут быть очищены в соответствии со стандартными процедурами

настоящей области техники, включая в себя осаждение сульфатом аммония, аффинные колонки, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и т.п., смотрите Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). Антитело или антигенсвязывающие фрагменты могут быть затем выделены из питательной среды, клеточных лизатов или клеточных мембранных фракций. Выделение и очистка, например, экспрессируемых микробами антител или антигенсвязывающих фрагментов, могут быть выполнены любыми обычными способами, такими как, например, препаративное хроматографическое разделение и иммунологическое разделение, например, включающее в себя применение моноклональных или поликлональных антител, направленных, например, против константной области антитела.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к гибридоме, которая обеспечивает бесконечно длительный источник моноклональных антител. В качестве альтернативы получению иммуноглобулинов непосредственно из культуры гибридом, иммортализованные клетки гибридомы могут быть использованы в качестве источника реаранжированных локусов тяжелой цепи и легкой цепи для последующей экспрессии и/или генетической манипуляции. Реаранжированные гены антител могут быть подвергнуты обратной транскрипции из соответствующих мРНК для получения кДНК. Согласно некоторым вариантам осуществления константная область тяжелой цепи может быть заменена на область с другим изотипом или полностью исключена. Вариабельные области могут быть связаны для кодирования одноцепочечных областей Fv. Множественные области Fv могут быть связаны для придания способности связывания более чем одной мишени или могут быть использованы химерные комбинации тяжелых и легких цепей. Любой подходящий способ может быть использован для клонирования вариабельных областей антител и получения рекомбинантных антител.

Согласно некоторым вариантам осуществления подходящую нуклеиновую кислоту, которая кодирует вариабельные области тяжелой и/или легкой цепи, получают и встраивают в векторы экспрессии, которые можно трансфицировать в стандартные рекомбинантные клетки-хозяева. Может быть использовано разнообразие таких клеток-хозяев. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки-хозяева млекопитающих могут быть применимы для эффективной обработки и производства. Типичные клеточные линии млекопитающих, применимые для этой цели, включают в себя клетки CHO, клетки 293 или клетки NSO. Получение антитела или антигенсвязывающего фрагмента можно осуществлять путем культивирования модифицированного рекомбинантного хозяина в условиях культивирования, подходящих для роста клеток-хозяев и экспрессии кодирующих последовательностей. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут быть выделены путем их выделения из культуры. Системы экспрессии могут быть разработаны так, чтобы включать в себя сигнальные пептиды так, чтобы полученные антитела секретировались в среду; однако внутриклеточное получение также возможно.

Настоящее раскрытие также включает в себя полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере вариабельную область цепи иммуноглобулина описанных в настоящем документе антител. Согласно некоторым вариантам осуществления вариабельная область, кодируемая полинуклеотидом, содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) VH и/или VL вариабельной области антитела, производимого любой из вышеописанных гибридом.

Полинуклеотиды, кодирующие антитело или антигенсвязывающие фрагменты, могут представлять собой, например, ДНК, кДНК, РНК или синтетически полученную ДНК или РНК, или рекомбинантно полученную молекулу химерной нуклеиновой кислоты, содержащую любой из этих полинуклеотидов, либо по отдельности, либо в комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотид представляет собой часть вектора. Такие векторы могут содержать дополнительные гены, такие как маркерные гены, которые позволяют выбирать вектор в подходящей клетке-хозяине и в подходящих условиях.

Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотид функционально связан с последовательностями контроля экспрессии, позволяющими экспрессию в прокариотических или эукариотических клетках. Экспрессия полинуклеотида предусматривает транскрипцию полинуклеотида в транскрибируемую мРНК. Регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию в эукариотических клетках, предпочтительно клетках млекопитающих, хорошо известны специалистам в настоящей области техники. Они могут включать в себя регуляторные последовательности, которые облегчают инициацию транскрипции, и необязательно поли-А-сигналы, которые облегчают терминацию транскрипции и стабилизацию транскрипта. Дополнительные регуляторные элементы могут включать в себя транскрипционные, а также трансляционные энхансеры и/или встречающиеся в природе или гетерологичные промоторные области. Возможные регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию в прокариотических клетках-хозяевах, включают в себя, например, промотор PL, Lac, Trp или Tac в *E.coli*, и примерами регуляторных элементов, обеспечивающих экспрессию в эукариотических клетках-хозяевах, являются промотор AOX1 или GAL1 в дрожжах или CMV-промотор, SV40-промотор, RSV-промотор (вирус саркомы Рауса), CMV-энхансер, SV40-энхансер или интрон глобина в клетках млекопитающих и других животных.

Помимо элементов, которые отвечают за инициацию транскрипции, такие регуляторные элементы могут также включать в себя сигналы терминации транскрипции, такие как SV40-поли-А-сайт или tk-поли-А-сайт, ниже по ходу транскрипции от полинуклеотида. Кроме того, в зависимости от используемой системы экспрессии могут быть добавлены лидерные последовательности, способные направлять

полипептид в клеточный компартмент или секретировать его в среду, к кодирующей последовательности полинуклеотида, и они были описаны ранее. Лидерную последовательность(и) собирают в соответствующей фазе с последовательностями трансляции, инициации и терминации и, предпочтительно, с лидерной последовательностью, способной направлять секрецию транслированного белка или его части, например, во внеклеточную среду. Необязательно, можно использовать гетерологичную полинуклеотидную последовательность, которая кодирует слитый белок, включающий в себя С- или N-концевой идентификационный пептид, придающий желательные характеристики, например, стабилизацию или упрощенную очистку экспрессированного рекомбинантного продукта.

Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотида, кодирующие по меньшей мере переменный домен легкой и/или тяжелой цепи, могут кодировать переменные домены обеих цепей иммуноглобулина или только одну. Аналогично, полинуклеотиды могут находиться под контролем одного и того же промотора или могут контролироваться отдельно для экспрессии. Кроме того, некоторые аспекты относятся к векторам, в частности к плазмидам, космидам, вирусам и бактериофагам, как правило, используемым в генной инженерии, которые содержат полинуклеотид, кодирующий переменный домен цепи иммуноглобулина антитела или антигенсвязывающего фрагмента; необязательно в комбинации с полинуклеотидом, который кодирует переменный домен другой иммуноглобулиновой цепи антитела.

Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности контроля экспрессии предоставляются в виде эукариотических промоторных систем в векторах, способных к трансформации или трансфекции эукариотических клеток-хозяев, но также можно использовать контрольные последовательности для прокариотических хозяев. Векторы экспрессии, полученные из вирусов, таких как ретровирусы, вирус коровьей оспы, аденоассоциированный вирус, вирусы герпеса или вирус папилломы крупного рогатого скота, могут использоваться для доставки полинуклеотидов или вектора в целевую популяцию клеток (например, для конструирования клетки для экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента). Разнообразные подходящие способы могут быть использованы для конструирования рекомбинантных вирусных векторов. Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотиды и векторы могут быть преобразованы в липосомы для доставки в клетки-мишени. Векторы, содержащие полинуклеотиды (например, переменный домен(ы) тяжелой и/или легкой цепей иммуноглобулинов, кодирующие последовательности и контролирующие экспрессию последовательности), можно переносить в клетку-хозяина подходящими способами, которые варьируют в зависимости от типа клеточного хозяина.

Способы скрининга могут предусматривать стадию оценки или подтверждения желаемой активности антитела или его фрагмента. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия предусматривает выбор способности ингибировать функцию-мишень, например, ингибирование высвобождения зрелого TGF $\beta$ 1 из латентного комплекса. Согласно некоторым вариантам осуществления эта стадия предусматривает отбор антител или их фрагментов, которые способствуют интернализации и последующему удалению комплексов антитело-антиген с поверхности клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления эта стадия предусматривает отбор антител или их фрагментов, которые индуцируют ADCC. Согласно некоторым вариантам осуществления эта стадия предусматривает отбор антител или их фрагментов, которые накапливаются в нужном сайте(ax) *in vivo* (например, типе клетки, ткани или органе). Согласно некоторым вариантам осуществления эта стадия предусматривает отбор антител или их фрагментов, способных преодолевать гематоэнцефалический барьер. Способы могут необязательно предусматривать стадию оптимизации одного или нескольких антител или их фрагментов для получения вариантов-аналогов, которые обладают желаемыми профилями, как определено такими критериями, как стабильность, аффинность связывания, функциональность (например, ингибирующая активность, функция Fc и т.д.), иммуногенность, чувствительность к pH и способность к развитию (например, высокая растворимость, низкая самоассоциация и т.д.). Такая стадия может предусматривать созревание аффинности антитела или его фрагмента. Полученное оптимизированное антитело предпочтительно представляет собой полностью человеческое антитело или гуманизированное антитело, подходящее для введения человеку. Процесс производства фармацевтической композиции, содержащей такое антитело или его фрагмент, может предусматривать стадии очистки, составления, стерильной фильтрации, упаковки и т.д. Некоторые стадии, такие как стерильная фильтрация, например, выполняются в соответствии с руководящими принципами, изложенными соответствующими регулирующими органами, такими как FDA. Такие композиции могут быть сделаны доступными в форме контейнеров одноразового использования, таких как предварительно заполненные шприцы, или контейнеров с множественной дозировкой, таких как флаконы.

#### Модификации.

Антитела или их антигенсвязывающие части по настоящему изобретению могут быть модифицированы с обнаруживаемой меткой или обнаруживаемым фрагментом, включая в себя, без ограничения, фермент, простетическую группу, флуоресцентный материал, люминесцентный материал, биолюминесцентный материал, радиоактивный материал, испускающий позитроны металл, нерадиоактивный ион

парамагнитного металла и аффинную метку для обнаружения и выделения комплекса GARP-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1. Обнаруживаемое вещество или фрагмент могут быть связаны или конъюгированы либо непосредственно с полипептидами по настоящему изобретению, либо опосредованно, через промежуточное соединение (такое как, например, линкер (например, расщепляемый линкер)), используя подходящие техники. Неограничивающие примеры подходящих ферментов включают в себя пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу, глюкозооксидазу или ацетилхолинэстеразу; неограничивающие примеры подходящих комплексов простетических групп включают в себя стрептавидин/биотин и авидин/биотин; неограничивающие примеры подходящих флуоресцентных материалов включают в себя биотин, умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного материала включает в себя люминол; неограничивающие примеры биолюминесцентных материалов включают в себя люциферазу, люциферин и экворин и примеры подходящего радиоактивного материала включают в себя ион радиоактивного металла, например, альфа-излучатели или другие радиоизотопы, такие как, например, йод ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{121}\text{I}$ ), углерод ( $^{14}\text{C}$ ), сера ( $^{35}\text{S}$ ), тритий ( $^3\text{H}$ ), индий ( $^{115}\text{mIn}$ ,  $^{113}\text{mIn}$ ,  $^{112}\text{In}$ ,  $^{111}\text{In}$ ) и технеций ( $^{99\text{Tc}}$ ,  $^{99\text{mTc}}$ ), таллий ( $^{201}\text{Tl}$ ), галлий ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ), палладий ( $^{103}\text{Pd}$ ), молибден ( $^{99}\text{Mo}$ ), ксенон ( $^{133}\text{Xe}$ ), фтор ( $^{18}\text{F}$ ),  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{86}\text{R}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{68}\text{Ge}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{65}\text{Zn}$ ,  $^{85}\text{Sr}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{153}\text{Gd}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{54}\text{Mn}$  и олово ( $^{113}\text{Sn}$ ,  $^{117}\text{Sn}$ ). Обнаруживаемое вещество может быть связано или конъюгировано либо непосредственно с антителами по настоящему изобретению, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, либо опосредованно, через промежуточное соединение (такое как, например, линкер), используя подходящие способы. Любое из антител, представленных в настоящем документе, которые конъюгированы с обнаруживаемым веществом, можно использовать для любых подходящих диагностических анализов, таких как описанные в настоящем документе.

Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие части по настоящему раскрытию также могут быть модифицированы с лекарственным средством. Лекарственное средство может быть связано или конъюгировано либо непосредственно с полипептидами по настоящему раскрытию, либо косвенно, через промежуточное соединение (такое как, например, линкер (например, расщепляемый линкер)), используя подходящие техники.

Нацеливающие средства.

Согласно некоторым вариантам осуществления способы по настоящему изобретению предусматривают применение одного или нескольких нацеливающих средств для нацеливания описанного в настоящем документе антитела или его антигенсвязывающей части на конкретный сайт у субъекта в целях модулирования высвобождения зрелого TGF $\beta$  из комплекс GARP-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1. Например, комплексы LTBP1-TGF $\beta$ 1 и LTBP3-TGF $\beta$ 1, как правило, локализируются во внеклеточном матриксе. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые в настоящем документе антитела могут быть конъюгированы со средствами, нацеленно воздействующими на внеклеточный матрикс, с целью локализации антител на сайтах, где находятся комплексы LTBP1-TGF $\beta$ 1 и LTBP3-TGF $\beta$ 1. Согласно таким вариантам осуществления селективное нацеливание антител приводит к селективной модуляции комплексов LTBP1-TGF $\beta$ 1 и/или LTBP3-TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления селективное нацеливание антител приводит к селективному ингибированию комплексов LTBP1-TGF $\beta$ 1 и/или LTBP3-TGF $\beta$ 1 (например, для лечения фиброза). Согласно некоторым вариантам осуществления средства, нацеленно воздействующие на внеклеточный матрикс, включают в себя связывающие гепарин средства, связывающие металлопротеиназу матрикса средства, связывающие лизилоксидазу домены, связывающие фибриллин средства, связывающие гиалуроновую кислоту средства и другие.

Аналогично, комплексы GARP-TGF $\beta$ 1, как правило, локализируются на поверхности клеток, например, активированных регуляторных T-клеток FOXP3+ (Treg). Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые в данном документе антитела могут быть конъюгированы со средствами, связывающими иммунные клетки (например, клетки Treg), с целью локализации антител в сайтах, где находятся комплексы GARP-TGF $\beta$ 1. Согласно таким вариантам осуществления селективное нацеливание антител приводит к селективной модуляции комплексов GARP-TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления селективное нацеливание антител приводит к селективному ингибированию комплексов GARP-TGF $\beta$ 1 (например, избирательному ингибированию высвобождения зрелого TGF $\beta$ 1 для целей иммуномодуляции, например, при лечении рака). Согласно таким вариантам осуществления средства, нацеленно воздействующие на клетки Treg, могут включать в себя, например, белки CCL22 и CXCL12 или их фрагменты.

Согласно некоторым вариантам осуществления могут быть использованы биспецифические антитела, содержащие первую часть, которая избирательно связывается с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1 и комплексом LTBP-TGF $\beta$ 1, и вторую часть, которая избирательно связывается с компонентом целевого сайта,

например, компонентом ЕСМ (например, фибриллин) или компонентом клетки Treg (например, CTLA-4).

Фармацевтические композиции.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены фармацевтические композиции, используемые в качестве лекарственного средства, подходящие для введения субъектам-людям и отличным от людей субъектам. Одно или несколько антител, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, могут быть составлены или смешаны с фармацевтически приемлемым носителем (вспомогательным веществом), включая в себя, например, буфер, для образования фармацевтической композиции. Такие составы могут быть использованы для лечения заболевания или нарушения, которое включает в себя передачу сигналов TGF $\beta$ . Согласно некоторым вариантам осуществления такое заболевание или нарушение, связанное с передачей сигналов TGF $\beta$ , включает в себя один или несколько контекстов, т.е. TGF $\beta$  ассоциируется с конкретным типом или типами презентующих молекул. Согласно некоторым вариантам осуществления такой контекст возникает в зависимости от типа клетки и/или ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления, например, такое зависящее от контекста действие передачи сигналов TGF $\beta$  частично опосредуется через GARP, LRRC33, LTBP1 и/или LTBP3.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело по настоящему изобретению специфично связывается с двумя или более контекстами TGF $\beta$ , так что антитело связывается с TGF $\beta$  в комплексе с презентующими молекулами, выбранными из двух или более из: GARP, LRRC33, LTBP1 и LTBP3. Таким образом, такие фармацевтические композиции можно вводить пациентам для облегчения связанных с TGF показаний (например, фиброза, иммунных нарушений и/или рака). "Приемлемый" означает, что носитель совместим с активным ингредиентом композиции (и предпочтительно способен стабилизировать активный ингредиент) и не является вредным для подлежащего лечению субъекта. Примеры фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ (носителей), включая в себя буферы, будут очевидны для специалиста в настоящей области техники и были описаны ранее. Смотрите, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K.E. Hoover. В одном примере описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция содержит более одного антитела, которое специфично связывается с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, где антитела распознают разные эпитопы/остатки комплекса GARP-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1.

Фармацевтические композиции для применения в настоящих способах могут содержать фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы в форме лиофилизированных составов или водных растворов (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover). Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях и могут включать в себя такие буферы, как фосфатный, цитратный и других органических кислот; антиоксиданты, включая в себя аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; такие алкилпарабены, как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; такие белки, как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; такие гидрофильные полимеры, как поливинилпирролидон; такие аминокислоты, как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая в себя глюкозу, маннозу или декстраны; такие хелатообразующие средства, как ЭДТА; такие сахара, как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; такие солеобразующие противоионы, как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEENTM, PLURONICSTM или полиэтиленгликоль (PEG). Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества дополнительно описаны в настоящем документе.

В некоторых примерах описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция содержит липосомы, содержащие антитело, которое специфично связывается с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, который может быть получен любым подходящим способом, таким как описанный в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980) и патентах США №4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенным временем циркуляции описаны в патенте США № 5013556. Особенно применимые липосомы могут быть получены способом обращено-фазового испарения с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и PEG-derivatизированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE). Липосомы экстрадируют через фильтры с определенным размером пор, чтобы получить липосомы с желаемым диаметром.

Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать или могут использоваться в сочетании с вспомогательным лекарственным

средством. Предполагается, что определенное вспомогательное лекарственное средство может усиливать иммунные ответы субъекта, например, на опухолевые антигены, и облегчать функцию Teffector, дифференцировку DC из моноцитов, усиленное поглощение антигена и презентацию APC и т.д. Подходящие вспомогательные лекарственные средства включают в себя, без ограничения, основанные на ретиноевой кислоте вспомогательные лекарственные средства и их производные, вспомогательные лекарственные средства на основе эмульсии масло-в-воде, такие как MF59 и другие сквален-содержащие вспомогательные лекарственные средства, лиганды Toll-подобного рецептора (TRL),  $\alpha$ -токоферол (витамин E) и их производные.

Антитела, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, также могут быть заключены в микрокапсулы, приготовленные, например, способами коацервации или межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметацрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсиях. Иллюстративные способы были описаны ранее, смотрите, например, Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20th Ed. Mack Publishing (2000).

В других примерах описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция может быть составлена в форме с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают в себя полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, причем эти матрицы имеют форму фасонных изделий, например, пленки или микрокапсулы. Примеры матриц замедленного высвобождения включают в себя сложные полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и 7-этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и ацетата лейпролида), изобутират ацетата сахарозы и поли-D-(-)-3-гидрокси-масляную кислоту.

Фармацевтические композиции, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко достигается, например, фильтрацией через стерильные фильтрующие мембраны. Композиции терапевтических антител, как правило, помещают в контейнер со стерильным отверстием для доступа, например, мешок для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

Описанные в настоящем документе фармацевтические композиции могут быть в единичных дозированных формах, таких как таблетки, пилюли, капсулы, порошки, гранулы, растворы или суспензии или суппозитории, для перорального, парентерального или ректального введения или введения путем ингаляции или инсуффляции.

Для приготовления твердых композиций, таких как таблетки, основной активный ингредиент может быть смешан с фармацевтическим носителем, например, с обычными ингредиентами для таблетирования, такими как кукурузный крахмал, лактоза, сахароза, сорбит, тальк, стеариновая кислота, стеарат магния, дикальцийфосфат или камеди и другие фармацевтические разбавители, например, вода, для образования твердой композиции до придания ей лекарственной формы, содержащей гомогенную смесь соединения по настоящему раскрытию или его нетоксичной фармацевтически приемлемой соли. Когда эти композиции до придания им лекарственной формы называются гомогенными, это означает, что активный ингредиент равномерно распределен по всей композиции, так что композицию можно легко подразделить на одинаково эффективные стандартные лекарственные формы, такие как таблетки, пилюли и капсулы. Эту твердую композицию до придания ей лекарственной формы затем подразделяют на стандартные лекарственные формы описанного выше типа, содержащие от 0,1 мг до приблизительно 500 мг активного ингредиента по настоящему раскрытию. Таблетки или пилюли новой композиции могут быть покрыты оболочкой или составлены иным образом для получения лекарственной формы, обеспечивающей преимущество пролонгированного действия. Например, таблетка или пилюля могут содержать внутреннюю дозировку и наружный дозировочный компонент, причем последний находится в форме оболочки над первым. Два компонента могут быть разделены энтеросолюбильным слоем, который служит для противодействия распаду в желудке и позволяет внутреннему компоненту без изменений проходить в двенадцатиперстную кишку или задерживаться при выделении. Для таких энтеросолюбильных слоев или покрытий могут быть использованы различные материалы, такие материалы включают в себя ряд полимерных кислот и смеси полимерных кислот с такими материалами, как шеллак, цетиловый спирт и ацетат целлюлозы.

Подходящие поверхностно-активные средства включают в себя, в частности, неионные средства, такие как полиоксиэтиленсорбитаны (например, Tween™ 20, 40, 60, 80 или 85) и другие сорбитаны (например, Span™ 20, 40, 60, 80 или 85). Композиции с поверхностно-активным средством, как правило, будут содержать от 0,05 до 5% поверхностно-активного средства и могут составлять от 0,1 до 2,5%. Понятно, что при необходимости могут быть добавлены другие ингредиенты, например, маннит или другие фармацевтически приемлемые наполнители.

Подходящие эмульсии могут быть приготовлены с использованием коммерчески доступных жировых эмульсий, таких как Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ и Lipiphysan™. Активный ингредиент может быть либо растворен в предварительно смешанной эмульсионной композиции, либо, альтернативно, он может быть растворен в масле (например, соевом масле, сафлоровом масле, хлопковом масле, кунжутном масле, кукурузном масле или миндальном масле) и эмульсии, образованной после смешивания с фосфолипидом (например, яичными фосфолипидами, соевыми фосфолипидами или соевым лецитином) и водой. Понятно, что могут быть добавлены другие ингредиенты, например, глицерин или глюкоза, для регулирования тоничности эмульсии. Подходящие эмульсии, как правило, содержат до 20% масла, например, от 5 до 20%.

Эмульсионные композиции могут быть такими, которые получены смешиванием антитела, которое специфично связывается с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1 с Intralipid™ или его компонентами (соевое масло, яичные фосфолипиды, глицерин и вода).

Фармацевтические композиции для ингаляции или инсуффляции включают в себя растворы и суспензии в фармацевтически приемлемых водных или органических растворителях или их смесях и порошки. Жидкие или твердые композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, как указано выше. Согласно некоторым вариантам осуществления композиции вводят пероральным или назальным дыхательным путем для местного или системного эффекта.

Композиции в предпочтительно стерильных фармацевтически приемлемых растворителях могут распыляться с использованием газов. Распыленные растворы можно вдыхать непосредственно из распыляющего устройства, или распыляющее устройство можно прикрепить к лицевой маске, тампону или дыхательному аппарату с прерывистым положительным давлением. Композиции в виде раствора, суспензии или порошка могут быть введены, предпочтительно, перорально или назально, из устройств, которые доставляют композицию соответствующим образом.

Выбор терапевтических показаний и/или субъектов, склонных к ответу на терапию, содержащую селективное в отношении TGFβ1 ингибирующее средство широкого спектра действия.

Два запроса могут быть сделаны относительно идентификации/выбора подходящих показаний и/или групп пациентов, для которых специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, вероятно, будут характеризоваться полезными эффектами: i) когда заболевание обусловлено или зависит от преимущественно изоформы TGFβ1 по сравнению с другими изоформами у человека; и ii) от того, включает ли заболевание дисрегуляцию множества аспектов функции TGFβ1.

Дифференциальная экспрессия трех известных изоформ TGFβ, а именно TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3, наблюдалась при нормальных (здоровых; гомеостатических), а также патологических состояниях в различных тканях. Тем не менее, концепция селективности в отношении изоформ не была полностью использована и не была достигнута с помощью традиционных подходов, которые способствуют пан-ингибированию TGFβ через множественные изоформы. Более того, профили экспрессии изоформ могут быть дифференцированно регулируемы не только в нормальных (гомеостатических) состояниях по сравнению с аномальными (патологическими), но также и в разных подгруппах пациентов. Поскольку большинство доклинических исследований проводятся на ограниченном количестве животных моделей, данные, полученные с использованием таких моделей, могут быть смещены, что приводит к неправильной интерпретации данных или вводит в заблуждение выводы относительно применимости к состояниям человека.

Соответственно, настоящее изобретение включает в себя признание того, что дифференциальная экспрессия изоформ TGFβ должна приниматься во внимание при прогнозировании эффективности конкретных ингибиторов, а также при интерпретации доклинических данных относительно трансляционной способности при состояниях человека. Как показано на фиг. 21, TGFβ1 и TGFβ3 являются доминантными в некоторых моделях мышинного сингенного рака (например, EMT-6 и 4T1), которые широко используются в доклинических исследованиях. Напротив, многие другие модели рака (например, S91, B16 и MBT-2) экспрессируют почти исключительно TGFβ1, аналогично тому, который наблюдается во многих опухолях человека, в которых TGFβ1, по-видимому, представляет собой чаще доминирующую изоформу над TGFβ2/3. Кроме того, изоформа(ы) TGFβ, преимущественно экспрессируемая в гомеостатических условиях, может не представлять собой ассоциированную с заболеванием изоформу(ы). Например, в нормальных тканях легких у здоровых крыс тоническая передача сигналов TGFβ, по-видимому, опосредована главным образом TGFβ3. Однако TGFβ1, по-видимому, заметно активируется при таких заболеваниях, как фиброз легких. В своей совокупности полезно исследовать или подтвердить относительную экспрессию изоформ TGFβ в клинических образцах, чтобы выбрать подходящие терапевтические средства, на которые пациент, вероятно, ответит.

Как описано в настоящем документе, селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 особенно применимы для лечения заболеваний, при которых изоформа TGFβ1 преимущественно экспресси-

руется по сравнению с другими изоформами. В качестве примера, на фиг. 21D представлен неограничивающий перечень клинических образцов рака человека с относительными уровнями экспрессии TGF $\beta$ 1 (слева), TGF $\beta$ 2 (в центре) и TGF $\beta$ 3 (справа). Каждая горизонтальная линия на трех изоформах представляет собой одного пациента. Как можно видеть, общая экспрессия TGF $\beta$ 1 значительно выше в большинстве этих опухолей человека, чем в двух других изоформах для многих типов опухолей, что позволяет предположить, что селективное ингибирование TGF $\beta$ 1 может быть применимым. Однако следует отметить некоторые исключения. Во-первых, такая тенденция не всегда применима у отдельных пациентов. Таким образом, даже при типе рака, который демонстрирует почти равномерное доминирование TGF $\beta$ 1 над TGF $\beta$ 2/3, есть несколько индивидуумов, которые не следуют этому общему правилу. Таким образом, пациенты, попадающие в подпопуляцию меньшинства, могут не отвечать на терапию, специфичную к изоформе, так, как это работает для большинства пациентов. Во-вторых, существует несколько типов рака, при которых TGF $\beta$ 1 является доминантным совместно с другой изоформой или при которых экспрессия TGF $\beta$ 2 и/или TGF $\beta$ 3 значительно выше, чем TGF $\beta$ 1. В этих ситуациях селективные в отношении TGF $\beta$ 1 ингибиторы, такие как описанные в настоящем документе, вряд ли будут эффективными. Следовательно, полезно исследовать или подтверждать относительные уровни экспрессии трех изоформ TGF $\beta$  (т.е. TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3) в клинических образцах, взятых у отдельных пациентов. Такая информация может обеспечить лучший прогноз эффективности конкретной терапии у отдельных пациентов, что может помочь обеспечить выбор подходящего лечения (например, установленного индивидуально лечения) для повышения вероятности клинического ответа.

Соответственно, настоящее изобретение включает в себя способ выбора популяции пациентов или субъекта, который, вероятно, ответит на терапию, содержащую специфичный к изоформе, пермиссивный по отношению к контексту ингибитор TGF $\beta$ 1.

Такой способ предусматривает следующие стадии: предоставление биологического образца (например, клинического образца), взятого у субъекта, определение (например, измерение или анализ) относительных уровней TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3 в образце и введение субъекту композиции, содержащей специфичный к изоформе, пермиссивный по отношению к контексту ингибитор TGF $\beta$ 1, если TGF $\beta$ 1 является доминирующей изоформой над TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3; и/или если TGF $\beta$ 1 значительно сверхэкспрессирован или активирован по сравнению с контролем. Относительные уровни изоформ могут быть определены с помощью анализов на основе РНК и/или анализов на основе белков, которые хорошо известны в настоящей области техники. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия введения может также предусматривать другую терапию, такую как ингибиторы иммунной контрольной точки или другие средства, предоставленные в другом месте настоящего документа. Такие способы могут необязательно предусматривать стадию оценки терапевтического ответа путем мониторинга изменений в относительных уровнях TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3 в двух или более временных точках. Согласно некоторым вариантам осуществления клинические образцы (такие как биопсии) собирают как до, так и после введения. Согласно некоторым вариантам осуществления клинические образцы (такие как биопсии) собирают несколько раз после воздействия для оценки эффектов *in vivo* с течением времени.

В дополнение к первому исследованию, связанному с аспектом селективности в отношении изоформы, второе исследование исследует широту функции TGF $\beta$ 1, вовлеченной в конкретное заболевание. Это может быть представлено числом контекстов TGF $\beta$ 1, а именно, какая презентующая молекула(ы) опосредует ассоциированную с заболеванием функцию TGF $\beta$ 1. Специфичные к TGF $\beta$ 1 ингибиторы широкого контекста, такие как пермиссивные по отношению к контексту и независимые от контекста ингибиторы, являются предпочтительными для лечения заболеваний, которые включают в себя как компонент ЕСМ, так и иммунный компонент функции TGF $\beta$ 1. Такое заболевание может быть ассоциировано с дисрегуляцией в ЕСМ, а также с нарушением функции иммунных клеток или иммунного ответа. Таким образом, описанные в настоящем документе ингибиторы TGF $\beta$ 1 способны нацеливаться на ЕСМ-ассоциированный TGF $\beta$ 1 (например, презентуемый LTBP1 или LTBP3), а также на ассоциированный с иммунными клетками TGF $\beta$ 1 (например, презентуемый GARP или LRRC33). Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы нацелены по меньшей мере на три из следующих терапевтических мишеней (например, "пермиссивные по отношению к контексту" ингибиторы): GARP-ассоциированный про/латентный TGF $\beta$ 1; LRRC33-ассоциированный про/латентный TGF $\beta$ 1; LTBP1-ассоциированный про/латентный TGF $\beta$ 1 и LTBP3-ассоциированный про/латентный TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы ингибируют все четыре терапевтические мишени (например, "независимые от контекста" ингибиторы): GARP-ассоциированный про/латентный TGF $\beta$ 1; LRRC33-ассоциированный про/латентный TGF $\beta$ 1; LTBP1-ассоциированный про/латентный TGF $\beta$ 1 и LTBP3-ассоциированный про/латентный TGF $\beta$ 1, чтобы широко ингибировать функцию TGF $\beta$ 1 в этих контекстах.

Независимо от того, связано или обусловлено ли конкретное состояние пациента несколькими аспектами функции TGF $\beta$ 1, можно оценить путем оценки профилей экспрессии презентующих молекул в клиническом образце, взятом у пациента. В настоящей области техники известны различные анализы,

включая в себя анализы на основе РНК и анализы на основе белка, которые могут проводиться для получения профилей экспрессии. Относительные уровни экспрессии (и/или их изменения) LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33 в образце(ах) могут указывать на источник и/или контекст активностей TGFβ1, связанных с состоянием. Например, образец биопсии, взятый из солидной опухоли, может демонстрировать высокую экспрессию всех четырех презентующих молекул. Например, LTBP1 и LTBP3 могут быть высоко экспрессированы в САФ в опухолевой строме, тогда как GARP и LRRC33 могут быть высоко экспрессированы ассоциированными с опухолью иммунными клетками, такими как Treg и инфилтрат лейкоцитов, соответственно.

Соответственно, настоящее изобретение включает в себя способ определения (например, исследования или подтверждения) вовлечения TGFβ1 в заболевание по сравнению с TGFβ2 и TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает стадию: идентификации источника (или контекста) ассоциированного с заболеванием TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления источник/контекст оценивают путем определения экспрессии молекул, презентующих TGF, например, LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33 в клиническом образце, взятом у пациентов.

Селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения широкого спектра заболеваний, нарушений и/или состояний, которые связаны с дисрегуляцией TGFβ1 (т.е. показаниями, связанными с TGFβ1) у субъектов-людей. Используемый в настоящем документе термин "заболевание (нарушение или состояние), связанное с дисрегуляцией TGFβ1" или "показание, связанное с TGFβ1", означает любое заболевание, нарушение и/или состояние, связанное с экспрессией, активностью и/или метаболизмом TGFβ1, или любое заболевание, нарушение и/или состояние, которое может получить преимущество от ингибирования активности и/или уровней TGFβ1.

Соответственно, настоящее изобретение включает в себя применение специфичного к изоформе, пермиссивного по отношению к контексту ингибитора TGFβ1 в способе лечения заболевания, связанного с дисрегуляцией TGFβ1, у человека. Такой ингибитор, как правило, составляет фармацевтическую композицию, которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Преимущественно, ингибитор нацелен как на ЕСМ-ассоциированный TGFβ1, так и на ассоциированный с иммунными клетками TGFβ1, но не нацелен на TGFβ2 или TGFβ3 *in vivo*. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор ингибирует стадию активации TGFβ1. Заболевание характеризуется дисрегуляцией или нарушением по меньшей мере двух из следующих признаков: а) регуляторных Т-клеток (Treg); б) пролиферации или функции эффекторных Т-клеток (Teff); в) пролиферации или дифференцировки миелоидных клеток; д) рекрутинг или дифференцировки моноцитов; е) функции макрофагов; ф) эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) и/или эндотелиально-мезенхимального перехода (EndMT); г) экспрессии генов в одном или нескольких маркерных генах, выбранных из группы, состоящей из: PAI-1, ACTA2, CCL2, Colla1, Col3a1, FN-1, CTGF и TGFβ1; h) компонентов или функции ЕСМ; и) дифференцировки фибробластов. Терапевтически эффективное количество такого ингибитора вводят субъекту, страдающему от заболевания или у которого заболевание диагностировано.

Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание включает в себя дисрегуляцию или нарушение компонентов ЕСМ, или функция предусматривает увеличение отложения коллагена I.

Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение дифференцировки фибробластов предусматривает увеличение количества миофибробластов или миофибробластоподобных клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления миофибробласты или миофибробластоподобные клетки представляют собой фибробласты, ассоциированные с раком (CAF). Согласно некоторым вариантам осуществления CAF связаны с опухолевой стромой и могут производить CCL2/MCP-1 и/или CXCL12/SDF-1.

Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение регуляторных Т-клеток предусматривает повышенную активность Treg.

Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение пролиферации или функции эффекторных Т-клеток (Teff) предусматривает супрессированную пролиферацию CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> клеток.

Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение пролиферации или дифференцировки миелоидных клеток предусматривает повышенную пролиферацию клеток-предшественников миелоидных клеток. Повышенная пролиферация миелоидных клеток может происходить в костном мозге,

Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение дифференцировки моноцитов предусматривает повышенную дифференцировку происходящих из костного мозга и/или тканевых резидентных моноцитов в макрофаги в участке заболевания, таком как фиброзная ткань и/или солидная опухоль.

Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение рекрутинга моноцитов предусматривает усиление рекрутинга происходящих из костного мозга моноцитов в участок заболевания, такой как ТМЕ, что приводит к увеличению дифференцировки макрофагов и поляризации M2 с последующим увеличением TAM.

Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение функции макрофагов предусматривает усиление поляризации макрофагов в фенотипы M2.

Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение пролиферации или дифференцировки миелоидных клеток предусматривает повышенное количество Treg, MDSC и/или TAN.

Показания, связанные с TGF, могут включать в себя состояния, содержащие исключительное иммунитет микроокружение заболевания, такое как опухоль или злокачественная ткань, которая частично супрессирует нормальный защитный механизм/иммунитет, исключая эффекторные иммунные клетки (например, CD4+ и/или CD8+ Т-клетки). Согласно некоторым вариантам осуществления такие исключительные иммунитет состояния связаны с плохой реакцией на лечение. Без желания ограничиваться конкретной теорией, предполагается, что ингибиторы TGF, такие как описанные в настоящем документе, могут помочь противостоять способности опухоли исключать противораковый иммунитет путем восстановления доступа к Т-клеткам.

Неограничивающие примеры связанных с TGF показаний, включают в себя: фиброз, включая в себя фиброз органов (например, фиброз почек, фиброз печени, фиброз сердца/сердечно-сосудистой системы и фиброз легких), склеродермию, синдром Альпорта, рак (включая в себя, без ограничения: рак крови, такой как лейкоз, миелофиброз, множественная миелома, рак толстой кишки, рак почки, рак молочной железы, злокачественную меланому, глиобластому), фиброз, связанный с солидными опухолями (например, злокачественная десмоплазия, такая как десмопластическая меланома, десмоплазия, связанная с раком поджелудочной железы, и десмоплазия при карциноме молочной железы), стромальный фиброз (например, стромальный фиброз молочной железы), радиационно-индуцированный фиброз (например, радиационный фиброзный синдром), содействие быстрому кроветворению после химиотерапии, заживление костей, заживление ран, деменция, миелофиброз, миелодисплазия (например, миелодиспластические синдромы или MDS), почечное заболевание (например, терминальная стадия почечной недостаточности или ESRD), односторонняя непроходимость мочеточника (UUO), потеря и/или дегенерация зубов, эндотелиальные синдромы пролиферации, бронхиальная астма и аллергия, желудочно-кишечные нарушения, анемия при старении, аневризма аорты, редкие показания (такие как синдром Марфана и болезнь Камурати-Энгельмана), ожирение, сахарный диабет, артрит, рассеянный склероз, мышечная дистрофия, боковой амиотрофический склероз), болезнь Паркинсона, остеопороз, остеоартроз, остеопения, метаболические синдромы, нарушения питания, атрофия органов, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и анорексия. Дополнительные показания могут включать в себя любые из тех, которые раскрыты в публикации США № 2013/0122007, публикации США № 8415459 или международной публикации № WO 2011/151432, содержание каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитела, их антигенсвязывающие части и композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения широкого спектра заболеваний, нарушений и/или состояний, связанных с передачей сигналов TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления ткани-/клетки-мишени предпочтительно экспрессируют изоформу TGFβ1 по сравнению с другими изоформами. Таким образом, настоящее изобретение включает в себя способы лечения такого состояния, связанного с экспрессией TGFβ1 (например, нарушение регуляции передачи сигналов TGFβ1 и/или активации экспрессии TGFβ1), с использованием фармацевтической композиции, которая содержит описанное в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающую часть.

Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание включает в себя TGFβ1, ассоциированный (например, презентуемый или депонированный из) с множественными клеточными источниками. Согласно некоторым вариантам осуществления такое заболевание включает в себя как иммунный компонент, так и компонент ECM функции TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления такое заболевание включает в себя: i) дисрегуляцию ECM (например, перепроизводство/отложение компонентов ECM, таких как коллагены и протеазы; измененную жесткость субстрата ECM; аномальную или патологическую активацию или дифференцировку фибробластов, таких как миофибробласты и CAF); ii) супрессию иммунитета вследствие повышенных Treg и/или супрессированных эффекторных Т-клеток (Teff), например, повышенных соотношений Treg/Teff; увеличенный инфильтрат лейкоцитов (например, макрофаги и MDSC), который вызывает супрессию CD4 и/или CD8 Т-клеток; и/или iii) аномальную или патологическую активацию, дифференцировку и/или рекрутинг миелоидных клеток, таких как макрофаги (например, происходящие из костного мозга моноциты/макрофаги и тканевые резидентные макрофаги), моноциты, происходящие из миелоидных клеток клетки-супрессоры (MDSC), нейтрофилы, дендритные клетки и NK-клетки.

Согласно некоторым вариантам осуществления состояние включает в себя TGFβ1, презентуемый более чем одним типом презентующих молекул (например, двумя или более из: GAPR, LRRC33, LTBP1 и/или LTBP3). Согласно некоторым вариантам осуществления затрагиваются ткани/органы/клетки, которые включают в себя TGFβ1 из множества клеточных источников. Чтобы привести только один пример, солидная опухоль (которая может также включать в себя пролиферативное забо-

ление, включающее в себя костный мозг, например, миелофиброз и множественную миелому), может включать в себя TGF $\beta$ 1 из нескольких источников, таких как раковые клетки, стромальные клетки, окружающие здоровые клетки, и/или инфильтрирующие иммунные клетки (например, лейкоциты CD45+), включающие в себя различные типы презентующих молекул. Соответствующие иммунные клетки включают в себя, без ограничения, миелоидные клетки и лимфоидные клетки, например, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, лимфоциты (например, В-клетки, Т-клетки и NK-клетки) и моноциты. Независимые от контекста или перmissive по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1 могут быть применимы для лечения таких состояний.

Неограничивающие примеры состояний или нарушений, которые можно лечить с помощью специфичных к изоформе, перmissive по отношению к контексту ингибиторов TGF $\beta$ 1, таких как описанные в настоящем документе антитела или их фрагменты, представлены ниже.

Заболевания с aberrантной экспрессией генов.

Наблюдалось, что аномальная активация пути трансдукции сигнала TGF $\beta$ 1 при различных патологических состояниях связана с измененной экспрессией генов ряда маркеров. Эти маркеры экспрессии генов (например, измеренные с помощью мРНК) включают в себя, без ограничения: Serpinel (кодирующий PAI-1), MCP-1 (также известный как CCL2), Col1a1, Col3a1, FN1, TGF $\beta$ 1, CTGF и ACTA2 (кодирующий  $\alpha$ -SMA). Интересно, что многие из этих генов участвуют в разнообразных заболеваниях, включая в себя различные типы фиброза органов, а также во многих раковых заболеваниях, которые включают в себя миелофиброз. Действительно, была предложена патофизиологическая связь между фиброзными состояниями и пролиферацией аномальных клеток, онкогенезом и метастазированием. Смотрите, например, Cox and Erler (2014) *Clinical Cnccr Research* 20(14): 3637-43 "Molecular pathways: connecting fibrosis and tumor metastasis"; Shiga et al. (2015) *Cancers* 7:2443-2458 "Cancer-associated fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth"; Wynn and Barron (2010) *Semin. Liver Dis.* 30(3): 245-257 "Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis", содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Не желая быть связанными конкретной теорией, авторы настоящего раскрытия предполагают, что путь передачи сигналов TGF $\beta$ 1 может фактически быть ключевой связью между этими широкими патологиями.

Например, считается, что MCP-1/CCL2 играет роль как при фиброзе, так и при раке. MCP-1/CCL2 характеризуется как профибротический хемокин и является хемотрактантом моноцитов, и данные свидетельствуют о том, что он может быть вовлечен как в начало, так и в прогрессирование рака. Было показано, что при фиброзе MCP-1/CCL2 играет важную роль в воспалительной фазе фиброза. Например, нейтрализация MCP-1 приводила к резкому снижению гломерулярного серповидного образования и отложению коллагена I типа.

Способность MCP-1/CCL2 рекрутировать моноциты/макрофаги имеет решающее значение для прогрессирования рака. Происходящий из опухоли MCP-1/CCL2 может стимулировать "злокачественные" фенотипы в макрофагах. Например, было показано, что при раке легкого MCP-1/CCL2 производится стромальными клетками и способствует метастазированию. При раке поджелудочной железы человека опухоли секретируют CCL2, и иммуносупрессивные CCR2-позитивные макрофаги проникают в эти опухоли. Пациенты с опухолями, которые проявляют высокую экспрессию CCL2/низкий CD8 Т-клеточный инфильтрат, значительно снижали выживаемость.

Аналогичным образом, участие PAI-1/Serpinel было вовлечено в различные виды рака, ангиогенез, воспаление, нейродегенеративные заболевания (например, болезнь Альцгеймера). Повышенная экспрессия PAI-1 в опухоли и/или сыворотке коррелирует с плохим прогнозом (например, более короткой выживаемостью, повышенным метастазированием) при различных видах рака, таких как рак молочной железы и рак мочевого пузыря (например, переходо-клеточный рак), а также миелофиброз. В контексте фиброзных состояний PAI-1 был признан важным последующим эффектором индуцированного TGF $\beta$ 1 фиброза, и повышенная экспрессия PAI-1 наблюдалась при различных формах фиброза тканей, включая в себя фиброз легких (таких как IPF), фиброз почек, фиброз печени и склеродермия.

Согласно некоторым вариантам осуществления эффекты *in vivo* терапии ингибитором TGF $\beta$ 1 можно оценивать путем измерения изменений в генных маркерах. Подходящие маркеры включают в себя TGF $\beta$  (например, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3). Согласно некоторым вариантам осуществления подходящие маркеры включают в себя гены мезенхимного перехода (например, AXL, ROR2, WNT5A, LOXL2, TWIST2, TAGLN и/или FAP), иммуносупрессивные гены (например, IL10, VEGFA, VEGFC), моноцитарные и макрофагальные хемотаксические гены (например, CCL2, CCL7, CCL8 и CCL13) и/или различные фиброзные маркеры, обсуждаемые в настоящем документе. Предпочтительными маркерами являются плазменные маркеры.

Как показано в приведенном в настоящем документе примере, описанные в настоящем документе специфичные к изоформе независимые от контекста ингибиторы TGF $\beta$ 1 могут снижать уровни экспрессии многих из этих маркеров в механистической модели на животных, такой как UUO, которая, как было показано, является TGF $\beta$ 1-зависимой. Следовательно, такие ингибиторы могут быть использованы для лечения заболевания или нарушения, характеризующегося аномальной экспрессией (например, сверх-

экспрессией/повышающей регуляцией или недостаточной экспрессией/понижающей регуляцией) одного или нескольких маркеров экспрессии генов.

Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления специфичный к изоформе, пермиссивный по отношению к контексту или независимый от контекста ингибитор TGF $\beta$ 1 используется при лечении заболевания, связанного со сверхэкспрессией одного или нескольких из следующего: PAI-1 (также известный как Serpinel), MCP-1 (также известный как CCL2), Col1a1, Col3a1, FN1, TGF $\beta$ 1, CTGF,  $\alpha$ -SMA, ITGA11 и ACTA2, причем лечение предусматривает введение ингибитора субъекту, страдающему от заболевания, в количестве, эффективном для лечения заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор используется для лечения заболевания, связанного со сверхэкспрессией PAI-1, MCP-1/CCL2, CTGF и/или  $\alpha$ -SMA. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание представляет собой миелофиброз. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание представляет собой рак, например, рак, содержащий солидную опухоль. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание представляет собой фиброз органов, например, фиброз печени, почки, легкого и/или сердечной или сердечно-сосудистой ткани.

Заболевания, включающие в себя протеазы.

Активация TGF $\beta$  из его латентного комплекса может запускаться интегрином зависимым от силы образом и/или протеазами. Данные свидетельствуют о том, что в этот процесс могут быть вовлечены определенные классы протеаз, включая в себя, без ограничения, протеазы Ser/Thr, такие как калликреины, хомотрипсин, эластазы, плазмин, а также цинковые металлопротеазы семейства MMP, такие как MMP-2, MMP-9 и MMP-13. MMP-2 разрушает наиболее распространенный компонент базальной мембраны, коллаген IV, повышая вероятность того, что он может играть роль в регуляции TGF $\beta$ 1, связанной с ECM. MMP-9 играет центральную роль в развитии опухоли, ангиогенезе, ремоделировании стромы и метастазировании. Таким образом, протеазозависимая активация TGF $\beta$ 1 в ECM может быть важной для лечения рака.

Калликреины (KLK) представляют собой трипсин- или хомотрипсин-подобные сериновые протеазы, которые включают в себя плазменные калликреины и тканевые калликреины. ECM играет роль в гомеостазе тканей, выступая в качестве структурного и сигнального каркаса и барьера для супрессии злокачественного роста. KLK могут играть роль в деградации белков ECM и других компонентов, которые могут способствовать росту и инвазии опухоли. Например, KLK1 сильно повышен при определенных видах рака молочной железы и может активировать про-MMP-2 и про-MMP-9. KLK2 активирует латентный TGF $\beta$ 1, делая рак предстательной железы, примыкающий к фибробластам, пермиссивным к росту рака. KLK3 широко изучался в качестве диагностического маркера рака предстательной железы (PSA). KLK3 может напрямую активировать TGF $\beta$ 1 путем превращения плазминогена в плазмин, который протеолитически расщепляет LAP. KLK6 может быть потенциальным маркером болезни Альцгеймера.

Кроме того, данные, приведенные в примере 8, указывают на то, что такие протеазы могут представлять собой калликреин. Таким образом, настоящее изобретение охватывает применение специфичного к изоформе, независимого от контекста или пермиссивного по отношению к контексту ингибитора TGF $\beta$  в способе лечения заболевания, связанного с калликреином или калликреин-подобной протеазой.

Известные активаторы TGF $\beta$ 1, такие как плазмин, TSP-1 и интегрин  $\alpha$ V $\beta$ 6, взаимодействуют непосредственно с LAP. Постулируется, что протеолитическое расщепление LAP может дестабилизировать взаимодействие LAP-TGF $\beta$ , тем самым высвобождая активный TGF $\beta$ 1. Предполагается, что область, содержащая 54-LSKLR-59, важна для поддержания латентности TGF $\beta$ 1. Таким образом, средства (например, антитела), которые стабилизируют взаимодействие или блокируют протеолитическое расщепление LAP, могут предотвращать активацию TGF $\beta$ .

Заболевания, вовлекающие эпителиально-мезенхимальный переход (EMT): EMT (эпителиальный мезенхимальный переход) представляет собой процесс, посредством которого эпителиальные клетки с жесткими соединениями переключаются на мезенхимальные свойства (фенотипы), такие как свободные межклеточные контакты. Процесс наблюдается в ряде нормальных биологических процессов, а также в патологических ситуациях, включая в себя эмбриогенез, заживление ран, раковый метастаз и фиброз (смотрите, например, Shiga et al. (2015) "Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth." *Cancers*, 7: 2443-2458). Как правило, считается, что сигналы EMT индуцируются главным образом TGF $\beta$ . Например, многие виды рака, по-видимому, включают в себя трансдифференцировку клеток в направлении мезенхимального фенотипа (такого как CAF), который коррелирует с худшим прогнозом. Таким образом, специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1, такие как описанные в настоящем документе, могут использоваться для лечения заболевания, которое инициируется или вызывается EMT. Действительно, приведенные в качестве примера данные (например, фиг. 12 и 13) показывают, что такие ингибиторы обладают способностью супрессировать экспрессию маркеров CAF *in vivo*, таких как  $\alpha$ -SMA, Coll (коллаген типа I) и FN (фибронектин). Заболевания, вовлекающие эндотелиально-мезенхимальный переход (EndMT): Аналогично, TGF $\beta$  также представляет собой ключевой регулятор эндотелиально-мезенхимального перехода (EndMT), наблюдаемого

при нормальном развитии, таком как формирование сердца. Тем не менее, то же или подобное явление также наблюдается при многих заболеваниях, таких как строма злокачественной опухоли. При некоторых патологических процессах эндотелиальные маркеры, такие как CD31, снижаются при воздействии TGF $\beta$ 1, и вместо этого индуцируется экспрессия мезенхимальных маркеров, таких как FSP-1,  $\alpha$ -SMA и фибронектин. Действительно, стромальные CAF могут быть получены из сосудистых эндотелиальных клеток. Таким образом, специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1, такие как описанные в настоящем документе, могут использоваться для лечения заболевания, которое инициируется или вызывается EndMT.

Заболевания, вовлеченные в уплотнение и ремоделирование матрикса: Прогрессирование фиброзных состояний включает в себя повышенные уровни компонентов матрикса, депонированных в ЕСМ, и/или поддержание/ремоделирование ЕСМ. TGF $\beta$ 1, по меньшей мере, частично способствует этому процессу. Это подтверждается, например, наблюдением того, что повышенное осаждение компонентов ЕСМ, таких как коллагены, может изменять механофизические свойства ЕСМ (например, жесткость матрикса/субстрата), и это явление связано с передачей сигналов TGF $\beta$ 1. Чтобы подтвердить это понятие, авторы настоящего изобретения оценили роль жесткости матрикса при влиянии на зависимую от интегрин активацию TGF $\beta$  в первичных фибробластах, трансфицированных про-TGF $\beta$  и LTBP1 и выращенных на субстратах на основе кремния с определенной жесткостью (например, 5 кПа, 15 кПа или 100 кПа). Как обобщено в разделе "Примеры" ниже, матриксы с большей жесткостью усиливают активацию TGF $\beta$ 1, и это может быть супрессировано специфичными к изоформе, пермиссивными по отношению к контексту ингибиторами TGF $\beta$ 1, такими как описанные в настоящем документе. Эти наблюдения предполагают, что TGF $\beta$ 1 влияет на свойства ЕСМ (такие как жесткость), что, в свою очередь, может дополнительно вызывать активацию TGF $\beta$ 1, отражающую прогрессирование заболевания. Таким образом, специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1, такие как описанные в настоящем документе, могут быть использованы для блокирования этого процесса для противодействия прогрессированию заболевания, включающему в себя изменения ЕСМ, такому как фиброз, рост опухоли, инвазия, метастазирование и десмоплазия. Группа LTBP таких ингибиторов может напрямую блокировать ЕСМ-ассоциированные про/латентные комплексы TGF $\beta$ , которые представлены LTBP1 и/или LTBP3, тем самым предотвращая активацию/высвобождение фактора роста из комплекса в нише заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1, такие как описанные в настоящем документе, могут нормализовать жесткость ЕСМ для лечения заболевания, которое включает в себя зависимую от интегрин передачу сигналов. Согласно некоторым вариантам осуществления интегрин содержит цепь  $\alpha$ 11 цепь  $\beta$ 1 или и то и другое.

#### Фиброз.

Согласно настоящему изобретению специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1, такие как описанные в настоящем документе, используются при лечении фиброза (например, фиброзных показаний, фиброзных состояний) у субъекта. Подходящие ингибиторы для осуществления настоящего изобретения включают в себя антитела и/или композиции согласно настоящему раскрытию, которые могут быть применимы для изменения или ослабления фиброза. Более конкретно, такие антитела и/или композиции являются селективными антагонистами TGF $\beta$ 1, которые способны нацеливаться на TGF $\beta$ 1, презентуемый различными типами презентующих молекул. TGF $\beta$ 1 распознается как центральный организатор фиброзного ответа. Антитела, нацеленные на TGF $\beta$ , уменьшают фиброз в многочисленных доклинических моделях. Такие антитела и/или соединения на основе антител включают в себя LY2382770 (Eli Lilly, Indianapolis, IN). Также включены те, которые описаны в патентах США № US 6492497, US 7151169, US 7723486 и публикации заявки на патент США № 2011/0008364, содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Антагонисты TGF $\beta$  предшествующего уровня техники включают в себя, например, средства, которые нацелены и блокируют зависимую от интегрин активацию TGF $\beta$ .

Однако данные свидетельствуют о том, что такие средства предшествующего уровня техники не могут опосредовать специфичное к изоформе ингибирование и могут вызывать нежелательные эффекты, непреднамеренно блокируя нормальную функцию TGF $\beta$ 2 и/или TGF $\beta$ 3. Действительно, данные, представленные в настоящем документе, поддерживают это понятие. Нормальные (непораженные заболеванием) ткани легких содержат относительно низкие, но измеримые уровни TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3, но заметно меньше TGF $\beta$ 1. Для сравнения, при определенных патологических состояниях, таких как фиброз, TGF $\beta$ 1 становится преимущественно активированным по сравнению с другими изоформами. Предпочтительно антагонисты TGF $\beta$  для применения при лечении таких состояний проявляют свою ингибирующую активность только в отношении изоформы, вызванной заболеванием или связанной с заболеванием, сохраняя при этом функцию других изоформ, которые обычно экспрессируются для опосредования тонической передачи сигналов в ткани. Преимущественно, как показано в примере 20 ниже, специфичный к изоформе, пермиссивный по отношению к контексту ингибитор TGF $\beta$ 1, охватываемый настоящим изо-

бретением, демонстрирует незначительный эффект в бронхоальвеолярном лаваже (BAL) у здоровых крыс, подтверждая мнение, что тоническая передача сигналов TGF $\beta$  (например, TGF $\beta$ 2 и/или TGF $\beta$ 3) невозмущена. Напротив, ингибиторы предшествующего уровня техники (LY2109761, низкомолекулярный антагонист рецептора TGF $\beta$  и моноклональное антитело, которое нацелено на интегрин  $\alpha$ V $\beta$ 6), оба, как показано, ингибируют последующую тоническую передачу сигналов TGF $\beta$  в неповрежденном заболевании BAL крысы, повышая вероятность того, что эти ингибиторы могут вызывать нежелательные побочные эффекты. Альтернативно или дополнительно, средства, которые нацелены и блокируют зависимость от интегрина активацию TGF $\beta$ , могут быть способны блокировать только подмножество интегринов, ответственных за связанную с заболеванием активацию TGF $\beta$ 1, среди многочисленных типов интегрин, которые экспрессируются различными типами клеток и играют роль в патогенезе. Кроме того, даже если такие антагонисты могут селективно блокировать опосредованную интегрином активацию изоформы TGF $\beta$ 1, это может быть неэффективно в блокировании активации TGF $\beta$ 1, запускаемой другими способами, такими как зависимость от протеазы активация. Напротив, специфичные к изоформе, перmissive по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1, такие как описанные в настоящем документе, направлены на предотвращение стадии активации TGF $\beta$ 1 независимо от конкретного способа активации, при сохранении селективности в отношении изоформы.

Фиброзные показания, для которых антитела и/или композиции по настоящему раскрытию могут применяться терапевтически, включают в себя, без ограничения, легочные показания (например, идиопатический легочный фиброз (IPF), хроническая обструктивная болезнь легких (COPD), аллергическая бронхиальная астма, острая форма повреждение легких, эозинофильный эзофагит, легочная артериальная гипертензия и химическое газовое повреждение), почечные показания (например, диабетический гломерулосклероз, фокальный сегментарный гломерулелероз (FSGS), хроническая болезнь почек (CKD), фиброз, связанный с трансплантацией почек и хроническим отторжением, IgA нефропатия и гемолитический уремический синдром), фиброз печени (например, неалкогольный стеатогепатит (NASH), хронический вирусный гепатит, паразитемия, врожденные нарушения обмена веществ, токсин-опосредованный фиброз, такой как алкогольный фиброз, неалкогольный стеатогепатит-гепатоцеллюлярная карцинома (NASH-HCC), первичный билиарный цирроз и склерозирующий холангит), сердечнососудистый фиброз (например, кардиомиопатия, гипертрофическая кардиомиопатия, атеросклероз и рестеноз, системный склероз, фиброз кожи (например, фиброз кожи при системном склерозе, диффузном кожном системном склерозе, склеродермии, патологическом рубцевании кожи, келоиде, послеоперационном рубцевании, рубцовой хирургии, индуцированном излучением рубцевании и хронических ранах) и формы рака или вторичный фиброз (например, мелофиброз, рак головы и шеи, острый мегакариобластный лейкоз M7 и мукозит). Другие заболевания, нарушения или состояния, связанные с фиброзом (включая в себя дегенеративные нарушения), которые можно лечить с использованием соединений и/или композиций по настоящему раскрытию, включают в себя, без ограничения, аденомиоз, эндометриоз, синдром Марфана, синдром жесткой кожи, склеродермию, ревматоидный артрит, артрит, фиброз костного мозга, болезнь Крона, язвенный колит, системную красную волчанку, мышечную дистрофию (например, DMD), болезнь Паркинсона, ALS, контрактуру Дюпюитрена, болезнь Камурати-Энгельмана, невральное рубцевание, деменцию, пролиферативную витреоретинопатию, повреждение роговицы, осложнения после операции по дренированию глаукомы и рассеянный склероз. Многие такие фиброзные признаки также связаны с воспалением пораженной ткани(ей), что указывает на участие иммунного компонента.

Согласно некоторым вариантам осуществления фиброзные показания, которые можно лечить с помощью композиций и/или способов, описанных в настоящем документе, включают в себя фиброз органов, такой как фиброз легких (например, IPF), фиброз почки (например, фиброз, связанный с CKD), фиброз печени, фиброз сердца или тканей сердца, фиброз кожи (например, склеродермия), фиброз матки (например, эндометрия, миометрия) и фиброз костного мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления такая терапия может уменьшить или отсрочить необходимость трансплантации органов у пациентов. Согласно некоторым вариантам осуществления такая терапия может продлить выживаемость пациентов.

Для лечения IPF пациенты, которые могут извлечь выгоду из лечения, включают в себя пациентов с семейной LPF и пациентов со спорадической IPF. Введение терапевтически эффективного количества специфичного к изоформе, перmissive по отношению к контексту ингибитора TGF $\beta$ 1 может уменьшить накопление миофибробластов в тканях легких, уменьшить отложения коллагена, уменьшить симптомы IPF, улучшить или поддержать функцию легких и продлить выживаемость. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор блокирует активацию ECM-ассоциированного TGF $\beta$ 1 (например, про/латентного TGF $\beta$ 1, презентуемого LTBP1/3) в фиброзном окружении LPF. Ингибитор может необязательно дополнительно блокировать активацию ассоциированного с макрофагами TGF $\beta$ 1 (например, про/латентного TGF $\beta$ 1, презентуемого LRRC33), например, альвеолярными макрофагами. В результате ингибитор может супрессировать высвобождение фибронектина и других факторов, связанных с фиброзом.

Специфичные к изоформе, перmissive по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1, такие как

те, которые представлены в настоящем документе, могут быть использованы для лечения фиброзных состояний печени, таких как жировая болезнь печени (например, NASH). Жировая болезнь печени может быть воспалена или может не быть. Воспаление печени из-за жировой болезни печени (т.е. стеатогепатит) может перерасти в рубцевание (фиброз), которое затем часто переходит в цирроз (рубцевание, которое искажает структуру печени и ухудшает ее функцию). Следовательно, ингибитор может быть использован для лечения таких состояний. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор блокирует активацию ECM-ассоциированного TGF $\beta$ 1 (например, про/латентного TGF $\beta$ 1, презентуемого LTBP1/3) в фиброзном окружении печени. Ингибитор может необязательно дополнительно блокировать активацию ассоциированного с макрофагами TGF $\beta$ 1 (например, про/латентного TGF $\beta$ 1, презентуемого LRRC33), например, клетки Купфера (также известные как звездчатые макрофаги), а также происходящие из инфильтрирующих моноцитов макрофаги и MDSC. В результате ингибитор может супрессировать факторы, ассоциированные с фиброзом. Введение ингибитора субъекту с такими состояниями может уменьшить один или несколько симптомов, предотвратить или замедлить прогрессирование заболевания, уменьшить или стабилизировать накопление жира в печени, уменьшить связанные с заболеванием биомаркеры (такие как фрагменты сывороточного коллагена), уменьшить рубцевание печени, уменьшить жесткость печени и/или иным образом привести к клинически значимым результатам в популяции пациентов, получавших ингибитор, по сравнению с контрольной группой, не получавшей ингибитор. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество ингибитора может приводить как к снижению содержания жира в печени, так и к уменьшению фиброза (например, рубцевания) у пациентов с NASH. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество ингибитора может приводить к улучшению при фиброзе по меньшей мере на одной стадии без обострения стеатогепатита у пациентов с NASH. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество ингибитора может снижать частоту возникновения печеночной недостаточности и/или рака печени у пациентов с NASH. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество ингибитора может нормализовать, по сравнению с контролем, уровни множественных воспалительных или фиброзных сывороточных биомаркеров, которые оценивают после начала терапии, например, через 12-36 недель. Согласно некоторым вариантам осуществления у пациентов с NASH специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1 могут вводиться пациентам, которые получают одну или несколько дополнительных терапий, включая в себя, без ограничения, ингибиторы миостатина, которые, как правило, могут усиливать метаболическую регуляцию у пациентов с клиническими проявлениями метаболического синдрома, включая в себя NASH.

Специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1, такие как те, которые представлены в настоящем документе, можно использовать для лечения фиброзных состояний почки, например, заболеваний, характеризующихся накоплением внеклеточного матрикса (IgA-нефропатия, фокальный и сегментарный гломерулосклероз, серповидный гломерулонефрит, волчаночный нефрит и диабетическая нефропатия), при которых наблюдалось значительное повышение экспрессии TGF $\beta$  в клубочках и тубулоинтерстиции. В то время как гломерулярное и тубулоинтерстициальное отложение двух матричных компонентов, индуцированных TGF $\beta$ , фибронектина EDA+ и PAI-1, было значительно повышено при всех заболеваниях с накоплением матрикса, корреляционный анализ выявил тесную связь, прежде всего, с изоформой TGF $\beta$ 1. Соответственно, специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1 применимы в качестве терапевтических средств для спектра гломерулярных нарушений человека, при которых TGF $\beta$  связан с патологическим накоплением внеклеточного матрикса.

Согласно некоторым вариантам осуществления фиброзное состояние почки связано с хроническим заболеванием почек (СКД). СКД вызвано главным образом высоким кровяным давлением или сахарным диабетом и уносит более одного миллиона жизней каждый год. Пациентам с СКД требуется пожизненное медицинское обслуживание, которое варьирует от строгих диет и лекарственных средств до диализа и трансплантации. Согласно некоторым вариантам осуществления описанная в настоящем документе терапия ингибитором TGF $\beta$ 1 может уменьшить или отсрочить необходимость в диализе и/или трансплантации. Согласно некоторым вариантам осуществления такая терапия может уменьшить потребность (например, дозировку, частоту) в других способах лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1 можно вводить пациентам, которые получают одну или несколько дополнительных терапий, включая в себя, без ограничения, ингибиторы миостатина, которые, как правило, могут усиливать метаболическую регуляцию у пациентов с СКД.

Фиброз органов, который можно лечить с помощью представленных в настоящем документе способов, включает в себя фиброз сердца (например, сердечно-сосудистый). Согласно некоторым вариантам осуществления фиброз сердца связан с сердечной недостаточностью, например, хронической сердечной недостаточностью (CFLF). Согласно некоторым вариантам осуществления сердечная недостаточность может быть связана с заболеваниями миокарда и/или заболеваниями обмена веществ. Согласно некоторым вариантам осуществления специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ин-

гибиторы TGF $\beta$ 1 можно вводить пациентам, которые получают одну или несколько дополнительных терапий, включая в себя, без ограничения, ингибиторы миостатина у пациентов с сердечной дисфункцией, которая включает в себя фиброз сердца и метаболическое нарушение.

Согласно некоторым вариантам осуществления фиброзные состояния, которые можно лечить с помощью описанных в настоящем документе композиций и/или способов, включают в себя десмоплазию. Десмоплазия может возникать вокруг новообразования, вызывая плотный фиброз вокруг опухоли (например, десмопластическая строма) или рубцовой ткани в брюшной полости после операции на брюшной полости. Согласно некоторым вариантам осуществления десмоплазия связана со злокачественной опухолью. Из-за его плотного образования, окружающего злокачественную опухоль, традиционные противораковые терапевтические средства (например, химиотерапия) могут не эффективно проникать в раковые клетки для клинических эффектов. Специфичные к изоформе, перmissive по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1, такие как те, что описаны в настоящем документе, могут быть использованы для нарушения десмоплазии, так что фиброзное образование может быть ослаблено, чтобы способствовать эффектам противораковой терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления в качестве монотерапии можно использовать специфичные к изоформе, перmissive по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1 (более подробно ниже).

Чтобы лечить пациентов с фиброзными состояниями, специфичные к изоформе, перmissive по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1 вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения фиброза. Эффективное количество такого антитела представляет собой количество, эффективное для достижения как терапевтической эффективности, так и клинической безопасности у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор представляет собой перmissive по отношению к контексту антитело, которое может блокировать активацию LTBP-опосредованного TGF $\beta$ 1, локализованного (например, связанного) в ECM, и GARP-опосредованного TGF $\beta$ 1, локализованного (например, связанного) в иммунных клетках. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой перmissive по отношению к контексту антитело, которое может блокировать активацию LTBP-опосредованного TGF $\beta$ 1, локализованного в ECM, и LRRC33-опосредованного TGF $\beta$ 1, локализованного (например, связанного на) в моноцитах/макрофагах. Согласно некоторым вариантам осуществления LTBP представляет собой LTBP1 и/или LTBP3. Согласно некоторым вариантам осуществления нацеливание и ингибирование TGF $\beta$ 1, презентуемого LRRC33 на профибротических, M2-подобных макрофагах в фиброзном микроокружении, может быть полезным.

Анализы, применимые для определения эффективности антител и/или композиций по настоящему изобретению в отношении изменения фиброза, включают в себя, без ограничения, гистологические анализы для подсчета фибробластов и основные иммуногистохимические анализы, известные в настоящей области техники.

#### Миелофиброз.

Миелофиброз, также известный как остеомиелофиброз, представляет собой относительно редкое пролиферативное заболевание костного мозга (рак), которое относится к группе заболеваний, называемых миелопролиферативными нарушениями. Миелофиброз классифицируется на филадельфийскую хромосомно-негативную (-) ветвь миелопролиферативных новообразований. Миелофиброз характеризуется клональной миелопролиферацией, aberrантным производством цитокинов, экстрамедуллярным гемопозом и фиброзом костного мозга. Пролiferация аномального клона гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге и других участках приводит к фиброзу или замене костного мозга рубцовой тканью. Термин миелофиброз, если не указано иное, относится к первичному миелофиброзу (PMF). Он может также упоминаться как хронический идиопатический миелофиброз (CLMF) (термины идиопатический и первичный означают, что в этих случаях заболевание неизвестного или спонтанного происхождения). Это контрастирует с миелофиброзом, который развивается вторично по отношению к истинной полицитемии или эссенциальной тромбоцитемии. Миелофиброз представляет собой форму миелоидной метаплазии, которая относится к изменению типа клеток в кроветворной ткани костного мозга, и часто эти два термина используются как синонимы. Термины агногенная миелоидная метаплазия и миелофиброз с миелоидной метаплазией (МММ) также используются для обозначения первичного миелофиброза. Согласно некоторым вариантам осуществления гематологические пролиферативные нарушения, которые можно лечить в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя миелопролиферативные нарушения, такие как миелофиброз. Так называемая "классическая" группа BCR-ABL (Ph) негативных хронических миелопролиферативных нарушений включает в себя эссенциальную тромбоцитемию (ET), истинную полицитемию (PV) и первичный миелофиброз (PMF).

Миелофиброз нарушает нормальное производство клеток крови. Результатом является обширное рубцевание в костном мозге, приводящее к тяжелой анемии, слабости, усталости и часто к увеличению селезенки. Производство цитокинов, таких как фактор роста фибробластов, аномальным клоном гемопоэтических клеток (особенно мегакариоцитами) приводит к замене кроветворной ткани костного мозга соединительной тканью посредством фиброза коллагена. Уменьшение гемопоэтической ткани ухудшает способность пациента производить новые клетки крови, что приводит к прогрессирующей панцитопе-

нии, дефициту всех типов клеток крови. Однако пролиферация фибробластов и отложение коллагена, как полагают, являются вторичным явлением, и сами фибробласты, возможно, не являются частью клона патологических клеток.

Миелофиброз может быть вызван аномальными стволовыми клетками крови в костном мозге. Аномальные стволовые клетки производят зрелые и плохо дифференцированные клетки, которые быстро растут и захватывают костный мозг, вызывая как фиброз (образование рубцовой ткани), так и хроническое воспаление.

Первичный миелофиброз связан с мутациями в Янус-киназе 2 (JAK2), рецепторе тромбопоэтина (MPL) и кальретикулине (CALR), которые могут привести к конститутивной активации пути JAK-STAT, прогрессирующему рубцеванию или фиброзу костного мозга. У пациентов может развиваться экстрамедуллярный гемопоэз, т.е. образование клеток крови, происходящее в местах, отличных от костного мозга, так как гемопоэтические клетки вынуждены мигрировать в другие области, в частности в печень и селезенку. Это вызывает увеличение этих органов. В печени аномальный размер называется гепатомегалией. Увеличение селезенки называется спленомегалией, которая также способствует возникновению панцитопении, в частности тромбоцитопении и анемии. Другим осложнением экстрамедуллярного кроветворения является пойкилоцитоз или наличие аномально сформированных эритроцитов.

Основным местом экстрамедуллярного кроветворения при миелофиброзе является селезенка, которая, как правило, заметно увеличивается у пациентов, страдающих миелофиброзом. В результате массивного расширения селезенки в селезенке часто возникают множественные субкапсулярные инфаркты, а это означает, что из-за прерывания подачи кислорода в селезенку происходит частичная или полная гибель ткани. На клеточном уровне селезенка содержит предшественники эритроцитов, предшественники гранулоцитов и мегакариоциты, при этом мегакариоциты преобладают по количеству и аномальной форме. Мегакариоциты могут участвовать в возникновении вторичного фиброза, наблюдаемого в этом состоянии.

Предполагается, что TGF $\beta$  может участвовать в фиброзном аспекте патогенеза миелофиброза (смотрите, например, Agarwal et al., "Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGF $\beta$ " (2016) *Stem Cell Investig* 3:5). Патология костного мозга при первичном миелофиброзе характеризуется фиброзом, неоангиогенезом и остеосклерозом, а фиброз связан с увеличением выработки коллагенов, депонированных в ECM.

Был описан ряд биомаркеров, чередование которых указывает на заболевание или коррелирует с ним. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркеры представляют собой клеточные маркеры. Такие связанные с заболеванием биомаркеры применимы для диагностики и/или мониторинга прогрессирования заболевания, а также эффективности терапии (например, реакции пациентов на терапию). Эти биомаркеры включают в себя ряд фиброзных маркеров, а также клеточных маркеров. Например, сообщается, что при раке легких концентрации TGF $\beta$ 1 в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BAL) значительно выше у пациентов, характеризующихся наличием рака легких, по сравнению с пациентами с доброкачественными заболеваниями (увеличение приблизительно в 2 раза), что также может служить биомаркером для диагностирования и/или мониторинга прогрессирования или лечения последствий рака легких.

Поскольку первичный миелофиброз связан с аномальным развитием мегакариоцитов, некоторые клеточные маркеры мегакариоцитов, а также их предшественники линии стволовых клеток могут служить маркерами для диагностики и/или мониторинга прогрессирования заболевания, а также эффективности терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления применимые маркеры включают в себя, без ограничения: клеточные маркеры дифференцированных мегакариоцитов (например, CD41, CD42 и Тро R), клеточные маркеры мегакариоцитов-эритроидных клеток-предшественников (например, CD34, CD38 и CD45RA-), клеточные маркеры общих миелоидных клеток-предшественников (например, IL-3 $\alpha$ /CD127, CD34, SCF R/c-kit и Flt-3/Flk-2) и клеточные маркеры гемопоэтических стволовых клеток (например, CD34, CD38-, Flt-3/Flk-2). Согласно некоторым вариантам осуществления применимые биомаркеры включают в себя фиброзные маркеры. К ним относятся, без ограничения: TGF $\beta$ 1, PAI-1 (также известный как Serpinel), MCP-1 (также известный как CCL2), Colla1, Col3a1, FN1, CTGF,  $\alpha$ -SMA, ACTA2, Timp1, Mmp8 и Mmp9. Согласно некоторым вариантам осуществления применимые биомаркеры представляют собой сывороточные маркеры (например, белки или фрагменты, найденные и обнаруженные в образцах сыворотки).

Основываясь на том факте, что TGF $\beta$  является компонентом ниши лейкозного костного мозга, предполагается, что нацеливание на микроокружение костного мозга с помощью ингибиторов TGF $\beta$  может быть многообещающим подходом к снижению лейкозных клеток, экспрессирующих презентующие молекулы, которые регулируют локальную доступность TGF $\beta$  в пораженной ткани.

Действительно, из-за многогранной природы патологии, которая проявляет TGF $\beta$ -зависимую дисрегуляцию как в миелолипролиферативном, так и в фиброзном аспектах (как предполагает сам термин "миелофиброз"), специфичные к изоформе, перmissive по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1, такие как те, что описаны в настоящем документе, могут обеспечивать особенно применимые

терапевтические эффекты для пациентов, страдающих миелофиброзом. Предполагается, что группа LTBP такого ингибитора может нацеливаться на ECM-ассоциированный комплекс TGF $\beta$ 1 в костном мозге, тогда как группа LRRC33 ингибитора может блокировать связанный с миелоидными клетками TGF $\beta$ 1. Кроме того, аномальная биология мегакариоцитов, связанная с миелофиброзом, может включать в себя GARP- и LTBP-опосредованную активность TGF $\beta$ 1. Специфичный к изоформе, пермиссивный по отношению к контексту ингибитор TGF $\beta$ 1 способен нацеливаться на такие комплексы, тем самым ингибируя высвобождение активного TGF $\beta$ 1 в нише.

Таким образом, такие ингибиторы TGF $\beta$ 1 применимы для лечения пациентов с истинной полицитемией, у которых был неадекватный ответ или непереносимость других (или стандартных) способов лечения, таких как гидроксимочевина и ингибиторы JAK. Такие ингибиторы также применимы для лечения пациентов с миелофиброзом промежуточного или высокого риска (MF), включая в себя первичный MF, MF после истинной полицитемии и MF после тромбоцитемии.

Соответственно, один аспект настоящего изобретения относится к способам лечения первичного миелофиброза. Способ предусматривает введение пациенту, страдающему первичным миелофиброзом, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей ингибитор TGF $\beta$ , который вызывает снижение доступности TGF $\beta$ . Согласно некоторым вариантам осуществления пациентам с миелофиброзом вводят специфичный к изоформе, пермиссивный по отношению к контексту ингибитор-моноклональное антитело активации TGF $\beta$ 1. Такое антитело можно вводить в дозах в диапазоне от 0,1 до 100 мг/кг, например, от 1 до 30 мг, например, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг, 20 мг/кг и т.д. Предпочтительными путями введения фармацевтической композиции, содержащей антитело, является внутривенное или подкожное введение. Когда композицию вводят внутривенно, пациенту может быть дано терапевтическое средство в течение подходящего периода времени, например, приблизительно 60 мин, на лечение, а затем повторяется каждые несколько недель, например, 3 недели, 4 недели, 6 недель и т.д. в общей сложности в течение нескольких циклов, например, 4 циклов, 6 циклов, 8 циклов, 10 циклов, 12 циклов и т.д. Согласно некоторым вариантам осуществления пациентов подвергают лечению композицией, содержащей ингибирующее антитело, при уровне дозы 1-10 мг/кг (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг) путем внутривенного введения каждые 28 дней (4 недели) в течение 6 циклов или 12 циклов. Согласно некоторым вариантам осуществления такое лечение вводят в виде хронической (долгосрочной) терапии (например, для продолжения в течение неопределенного периода времени, пока считается полезным) вместо прекращения после установленного количества циклов введения.

Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGF $\beta$  представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, которая связывается с неактивным (например, латентным) комплексом про-TGF $\beta$ , тем самым предотвращая высвобождение активного или зрелого TGF $\beta$  из комплекса, эффективно ингибируя стадию активации. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело или его антигенсвязывающая часть специфично связываются с комплексом про-TGF, который связан с LRRC33, GARP, LTBP1, LTBP3 или любой их комбинацией. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело или его антигенсвязывающая часть специфично связываются со связанным с клеткой комплексом про-TGF $\beta$ . Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его часть селективно связывается с комплексом про-TGF, который ассоциирован или с LRRC33, и/или с GARP (но не с LTBP1 или LTBP3). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его часть специфично связывается с комплексом про-TGF $\beta$ , который связан с LRRC33. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его часть специфично связывается с комплексом про-TGF $\beta$ , который ассоциирован с GARP. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его часть специфично связывается с комплексом про-TGF $\beta$ , который ассоциирован с LRRC33, а также комплексом про-TGF $\beta$ , который ассоциирован с GARP.

Альтернативно или дополнительно к вариантам осуществления, обсужденным выше, ингибитор TGF $\beta$  представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, которая связывается с LRRC33 и/или GARP и содержит домен для дополнительных эффекторных функций. Согласно некоторым вариантам осуществления домен для дополнительной эффекторной функции может представлять собой Fc или Fc-подобный домен для опосредования ADCC в клетках-мишенях. Предпочтительно, ADCC-индуцирующее антитело не запускает и не облегчает интернализацию, чтобы в достаточной мере позволить ADCC-опосредованное уничтожение клеток-мишеней.

Альтернативно или дополнительно к вариантам осуществления, обсужденным выше, антитело или его антигенсвязывающая часть могут включать в себя дополнительный фрагмент для переноса представляющего интерес "молекулярного груза" (например, конъюгаты антитело-лекарственное средство или ADC). Примеры подходящего молекулярного груза включают в себя, без ограничения: терапевтические средства/лекарственные средства, токсины, маркеры и метки для обнаружения/визуализации и т.д. Такой молекулярный груз может представлять собой химические объекты, небольшие молекулы, полипептиды, нуклеиновые кислоты, радиоизотопы и т.д. Предпочтительно, антитела, которые являются подходящими для ADC-опосредованного механизма действия, могут при связывании с клеточной поверхностью-мишенью запускать эффективную интернализацию комплекса антиген-антитело, чтобы доставлять моле-

кулярный груз в клетку.

Поскольку миелофиброз представляет собой прогрессирующее заболевание, которое проявляется многими аспектами патологии во многих пораженных тканях или органах, терапевтический подход может варьировать в зависимости от прогрессирования заболевания. Например, в первичном участке заболевания (в костном мозге) предполагается, что подходящая терапия включает в себя описанный в настоящем документе ингибитор LRRC33, который может воздействовать на гемопоэтические клетки, экспрессирующие LRRC33. Это может быть достигнуто путем введения композиции, содержащей антитело, которое связывается с презентующим LRRC33 комплексом про-TGFβ и ингибирует активацию TGFβ у пациента. Это также может быть достигнуто путем введения композиции, содержащей антитело, которое связывается с LRRC33, и индуцирующей уничтожение клеток-мишеней у пациента. Альтернативно, эти подходы могут быть объединены, чтобы использовать антитело, которое является ингибитором активации TGFβ, а также содержит дополнительный фрагмент, обеспечивающий клеточную цитотоксичность. Например, дополнительный фрагмент может представлять собой Fc или Fc-подобный домен для индукции ADCC или токсин, конъюгированный с антителом, в качестве молекулярного груза (например, конъюгаты антитело-лекарственное средство или ADC).

Хотя миелофиброз можно рассматривать как тип лейкоза, он характеризуется проявлением фиброза. Поскольку известно, что TGFβ регулирует аспекты гомеостаза ECM, дисрегуляция которого может привести к фиброзу тканей, предполагается, что согласно некоторым вариантам осуществления желательнее ингибировать активность TGFβ, связанную с ECM. Соответственно, антитела или их фрагменты, которые связывают и ингибируют про-TGFβ, презентуемый LTBP (такими как LTBP1 и LTBP3), охватываются настоящей изобретением. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их фрагменты, подходящие для лечения миелофиброза, являются "пермиссивными по отношению к контексту" в том смысле, что они могут связываться с множеством контекстов комплекса про-TGFβ, таких как те, которые ассоциированы с LRRC33, GARP, LTBP1, LTBP3 или любой их комбинацией. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело является независимым от контекста ингибитором активации TGFβ, характеризующееся тем, что антитело может связывать и ингибировать любой из следующих латентных комплексов: LTBP1-про-TGFβ, LTBP3-про-TGFβ, GARP-про-TGFβ и LRRC33-про-TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело представляет собой специфичное к изоформе антитело, которое связывает и ингибирует такие латентные комплексы, которые содержат одну, но не другие изоформы TGFβ. К ним относятся, например, LTBP1-про-TGFβ1, LTBP3-про-TGFβ1, GARP-про-TGFβ1 и LRRC33-про-TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело представляет собой селективное в отношении изоформы антитело, которое по существу связывает и ингибирует одну или несколько изоформ TGFβ. Предполагается, что антитела, которые могут ингибировать активацию TGFβ1 пермиссивным по отношению к контексту или независимым от контекста образом, являются предпочтительными для применения при лечении миелофиброза.

Подходящие популяции пациентов с миелопролиферативными новообразованиями, которых можно лечить с помощью описанных в настоящем документе композиций и способов, могут включать в себя, без ограничения: а) популяцию пациентов с филадельфией (+); б) популяцию пациентов с филадельфией (-); в) популяцию пациентов, которая классифицируется как "классическая" (PV, ET и PMF); г) популяцию пациентов с мутацией JAK2V617F(+); д) популяцию пациентов, несущих JAK2V617F (-); е) популяцию пациентов с экзоном 12(+) JAK2; з) популяцию пациентов с MPL(+) и и) популяцию пациентов с CALR(+).

Согласно некоторым вариантам осуществления популяция пациентов включает в себя пациентов с промежуточным уровнем 2 или высоким риском миелофиброза. Согласно некоторым вариантам осуществления популяция пациентов содержит субъектов с миелофиброзом, которые не поддаются лечению или не являются кандидатами на доступную терапию. Согласно некоторым вариантам осуществления количество тромбоцитов у субъекта составляет от  $100-200 \times 10^9/\text{л}$ . Согласно некоторым вариантам осуществления количество тромбоцитов у субъекта составляет  $>200 \times 10^9/\text{л}$  до получения лечения.

Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта, который должен получать (и кому может быть полезно получать) специфичную к изоформе, пермиссивную по отношению к контексту терапию ингибитором TGFβ1, диагностируют первичный миелофиброз (PMF) с промежуточным 1 или более высоким уровнем или миелофиброз после истинной полицитемии/эссенциальной тромбоцитемии (пост-PV/ET MF). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект характеризуется задокументированным фиброзом костного мозга до лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект характеризуется MF-2 или выше, как оценивается по европейскому общему баллу оценки и 3-й степени или выше по модифицированной шкале Бауэрмайстера до начала лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект характеризуется состоянием эффективности ECOG, равным 1, до лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления количество лейкоцитов ( $10^9/\text{л}$ ) у субъекта составляет в диапазоне от 5 до 120 до лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта имеется аллельная нагрузка JAK2V617F, которая находится в диапазоне 10-100%.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, который получает (и кому может быть по-

лезно получать) специфичную к изоформе, пермиссивную по отношению к контексту терапии ингибитором TGFβ1, является зависимым от трансфузии (до лечения), характеризующийся тем, что у субъекта в анамнезе имеется по меньшей мере две единицы переливания эритроцитов в прошлом месяце при уровне гемоглобина менее чем 8,5 г/дл, который не связан с клинически явным кровотечением.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, который должен получать (и кому может быть полезно получать) специфичную к изоформе, пермиссивную по отношению к контексту терапии ингибитором TGFβ1, ранее получал терапию для лечения миелофиброза. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект подвергался лечению одной или несколькими терапиями, включая в себя, без ограничения: AZD1480, панобиностат, EPO, IFNα, гидроксимочевину, пегилированный интерферон, талидомид, преднизон и ингибитор JAK2 (например, лестауртиниб, CEP-701).

Согласно некоторым вариантам осуществления пациент характеризуется экстрамедуллярным гемопоэзом. Согласно некоторым вариантам осуществления экстрамедуллярный гемопоэз находится в печени, легких, селезенке и/или лимфатических узлах. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят локально в один или несколько локализованных участков проявления заболевания.

Специфичный к изоформе, пермиссивный по отношению к контексту ингибитор TGFβ1 вводят пациентам в количестве, эффективном для лечения миелофиброза. Терапевтически эффективное количество представляет собой количество, достаточное для ослабления одного или нескольких симптомов и/или осложнений миелофиброза у пациентов, включая в себя, без ограничения: чрезмерное отложение ЕСМ в строме костного мозга, неоангиогенез, остеосклероз, спленомегалию, гематомегалию, анемию, кровотечение, боль в костях и другие связанные с костями заболевания, экстрамедуллярный гемопоэз, тромбоцитоз, лейкопению, кахексию, инфекции, тромбоз и смерть.

Согласно некоторым вариантам осуществления количество является эффективным для снижения экспрессии и/или секреции TGFβ1 (таких как мегакариоцитарные клетки) у пациентов. Следовательно, такой ингибитор может снижать уровни мРНК TGFβ1 у подвергнутых лечению пациентов. Согласно некоторым вариантам осуществления такой ингибитор снижает уровни мРНК TGFβ1 в костном мозге, например, в мононуклеарных клетках. У пациентов с PMF, как правило, наблюдается повышенное содержание TGFβ1 в плазме, превышающее ~2500 пг/мл, например, превышающее 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 и 10000 пг/мл (в отличие от нормальных диапазонов ~600-2000 пг/мл по данным ИФА (смотрите, например, Mascaremmas et al. (*Leukemia & Lymphoma*, 2014, 55(2): 450-452)). Zingariello (*Blood*, 2013, 121(17): 3345-3363) количественно определил биоактивное и общее содержание TGFβ1 в плазме пациентов с PMF и контрольных индивидуумов. Согласно этой ссылке, медианный биоактивный TGFβ1 у пациентов с PMF составлял 43 нг/мл (в диапазоне 4-218 нг/мл), а общий TGFβ1 составлял 153 нг/мл (32-1000 нг/мл), тогда как в контрольных аналогах значения были 18 (0,05-144) и 52 (8-860), соответственно. Таким образом, на основании этих сообщений содержание TGFβ1 в плазме у пациентов с PMF увеличивается в несколько раз, например, в 2, 3, 4, 5 раз и т.д. по сравнению с контрольными или здоровыми образцами плазмы. Лечение ингибитором, например, после 4-12 циклов введения (например, 2, 4, 6, 8, 10, 12 циклов) или хроническое или длительное лечение, например, каждые 4 недели, в дозе 0,1-100 мг/кг (например, 1-30 мг/кг моноклонального антитела), описанное в настоящем документе, может снижать уровни TGFβ1 в плазме по меньшей мере на 10% относительно соответствующего исходного уровня (предварительное лечение), например, по меньшей мере на 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% и 50%.

Некоторые терапевтические эффекты могут наблюдаться относительно быстро после начала лечения, например, через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель или 6 недель. Например, ингибитор может эффективно увеличивать количество стволовых клеток и/или клеток-предшественников в костном мозге пациентов, которых лечили ингибитором, в течение 1-8 недель. К ним относятся гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники крови. Для оценки изменений частоты/количества клеток костного мозга может быть выполнена биопсия костного мозга. Соответственно, у пациента могут проявляться улучшенные симптомы, такие как боль в костях и усталость.

Одним из морфологических признаков миелофиброза является фиброз в костном мозге (например, строме костного мозга), который частично характеризуется aberrантным ЕСМ. Согласно некоторым вариантам осуществления количество является эффективным для уменьшения чрезмерного отложения коллагена, например, мезенхимальными стромальными клетками. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор эффективен для уменьшения количества CD41-позитивных клеток, например, мегакариоцитов, у подвергаемых лечению субъектов, по сравнению с контрольными субъектами, которые не получают лечение. Согласно некоторым вариантам осуществления исходные частоты мегакариоцитов в костном мозге PMF могут находиться в диапазоне от 200 до 700 клеток на квадратный миллиметр (мм<sup>2</sup>) и от 40 до 300 мегакариоцитов на квадратный миллиметр (мм<sup>2</sup>) в селезенке PMF, что определяется с помощью случайно выбранных срезов. Напротив, частота мегакариоцитов в костном мозге и селезенке нормальных доноров составляет менее чем 140 и менее чем 10, соответственно. Воздействие ингибитором может уменьшить количество (например, частоты) мегакариоцитов в костном мозге и/или

селезенке. Согласно некоторым вариантам осуществления воздействие ингибитором может вызывать пониженные уровни последующей эффекторной передачи сигналов, такой как фосфорилирование SMAD2/3.

Пациенты с миелофиброзом могут страдать от увеличения селезенки. Таким образом, клинические эффекты терапевтического средства могут оцениваться путем мониторинга изменений размера селезенки. Размер селезенки может быть исследован известными способами, такими как оценка длины селезенки путем пальпации и/или оценка объема селезенки с помощью ультразвука. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, которого подвергают лечению с помощью специфичного к изоформе, пермиссивного по отношению к контексту ингибитора TGF $\beta$ 1, характеризуется исходной длиной селезенки (до лечения) 5 см или более, например, в диапазоне от 5 до 30 см, как оценивают при пальпации. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, подлежащий лечению специфичным к изоформе, пермиссивным по отношению к контексту ингибитором TGF $\beta$ 1, характеризуется исходным объемом селезенки (до лечения), равным 300 мл или более, например, в диапазоне 300-1500 мл, согласно оценке УЗИ. Описанное в настоящем документе лечение ингибитором, например, в течение 4-12 циклов введения (например, 2, 4, 6, 8, 10, 12 циклов), например, каждые 4 недели, в дозе 0,1-30 мг/кг моноклонального антитела) может уменьшить размер селезенки у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество ингибитора является достаточным для уменьшения размера селезенки в популяции пациентов, которые получают лечение ингибитором, по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 50% и 60%, относительно соответствующих исходных значений. Например, лечение эффективно для достижения уменьшения объема селезенки >35% от исходного уровня через 12-24 недели, как измерено с помощью МРТ или КТ-сканирования, по сравнению с контролем плацебо. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение эффективно для достижения уменьшения объема селезенки на 35% по сравнению с исходным уровнем через 24-48 недель, как измерено с помощью МРТ или КТ-сканирования, по сравнению с наилучшим доступным теоретическим контролем. Наилучшая доступная терапия может включать в себя гидроксимочевину, глюкокортикоиды, а также медикаменты, анагрелид, эпоэтин альфа, талидомид, леналидомид, меркаптопурин, тиогуанин, даназол, пегинтерферон альфа-2а, интерферон- $\alpha$ , мелфалан, ацетилсалициловую кислоту и ацетилсалициловую кислоту.

Согласно некоторым вариантам осуществления популяция пациентов, получавших специфичный к изоформе, пермиссивный по отношению к контексту ингибитор TGF $\beta$ 1, такой как описанный в настоящем документе, демонстрирует статистически улучшенный ответ на лечение, как оценивается, например, критериями Международной рабочей группы по исследованию и лечению миелофиброза (IWG-MRT), степенью изменения степени фиброза костного мозга, измеренной по модифицированной шкале Бауэрмейстера, и всеобщей европейской системой оценки после лечения (например, 4, 6, 8 или 12 циклов), ответом симптомов с использованием формы для оценки симптомов миелопролиферативного новообразования (MPN-SAF).

Согласно некоторым вариантам осуществления лечение специфичным к изоформе, пермиссивным по отношению к контексту ингибитором TGF $\beta$ 1, таким как описанный в настоящем документе, достигает статистически улучшенного ответа на лечение, который оценивают, например, с помощью модифицированной формы оценки симптомов миелофиброза (MFSAF), в которой симптомы измеряются с помощью инструмента MFSAF (например, v2.0), дневника, фиксирующего изнурительные симптомы миелофиброза (дискомфорт в животе, ранняя сытость, боль под левыми ребрами, зуд, ночной пот и боль в костях/мышцах) с использованием шкалы от 0 до 10, где 0 отсутствует, а 10 - худший из возможных. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение является эффективным для достижения 50%-ного снижения общего балла MFSAF по сравнению с исходным уровнем, например, через 12-24 недели. Согласно некоторым вариантам осуществления значительная часть пациентов, получающих терапию, достигает  $\geq$ 50% общего показателя симптомов по сравнению с пациентами, принимающими плацебо. Например, доля пула пациентов для достижения улучшения  $\geq$ 50% может составлять более чем 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80%.

Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтически эффективное количество ингибитора представляет собой количество, достаточное для достижения клинического улучшения, оцениваемого по ответу анемии. Например, улучшенный ответ анемии может включать в себя более длительные периоды независимости от переливания, например, 8 недель или более, после лечения 4-12 циклами, например, 6 циклами.

Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтически эффективное количество ингибитора представляет собой количество, достаточное для поддержания стабильного заболевания в течение периода времени, например, 6 недель, 8 недель, 12 недель, шести месяцев и т.д. Согласно некоторым вариантам осуществления прогрессирование заболевания можно оценивать по изменениям общей клеточности костного мозга, степени фиброза ретикулина или коллагена и/или изменению нагрузки аллеля JAK2V617F.

Согласно некоторым вариантам осуществления популяция пациентов, которую подвергали лечению специфичным к изоформе, пермиссивным по отношению к контексту ингибитором TGF $\beta$ 1, таким как описанные в настоящем документе, демонстрирует статистически улучшенную выживаемость по

сравнению с контрольной группой, которая не получает лечение. Например, в контрольных группах медиана выживаемости пациентов с PMF составляет приблизительно шесть лет (приблизительно 16 месяцев у пациентов с высоким риском), и ожидается, что менее 20% пациентов выживут через 10 лет или дольше после постановки диагноза. Лечение специфичным к изоформе, пермиссивным по отношению к контексту ингибитором TGFβ1, таким как описанные в настоящем документе, может продлить время выживания по меньшей мере на 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев, 36 месяцев или 48 месяцев. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение эффективно для достижения улучшенной общей выживаемости через 26 недель, 52 недели, 78 недель, 104 недели, 130 недель, 144 недели или 156 недель по сравнению с пациентами, которые получают плацебо.

Клинические преимущества терапии, такие как приведенные в качестве примера выше, могут наблюдаться у пациентов с вновь начавшейся анемией или без нее.

Одна из выгодных особенностей специфичных к изоформе, пермиссивных по отношению к контексту ингибиторов TGFβ1 заключается в том, что они поддерживают улучшенные профили безопасности, обусловленные селективностью в отношении изоформы, по сравнению с обычными антагонистами TGFβ, которые не обладают селективностью. Следовательно, ожидается, что лечение специфичным к изоформе, пермиссивным по отношению к контексту ингибитором, таким как описанные в настоящем документе, может снизить нежелательные явления в популяции пациентов по сравнению с эквивалентными популяциями пациентов, которых подвергают лечению обычными антагонистами TGFβ, в отношении частоты и/или серьезности таких событий. Таким образом, специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту ингибиторы TGFβ1 могут обеспечить более широкий терапевтический интервал в отношении дозировки и/или продолжительности лечения.

Нежелательные явления могут быть оценены с помощью признанных в настоящей области техники подходящих способов, таких как Общие терминологические критерии нежелательных явлений (CTCAE), версия 4. Ранее сообщалось, что нежелательные явления у людей, получавших антагонисты TGFβ, такие как GC1008, включают в себя: лейкоцитоз (степень 3), усталость (степень 3), гипоксию (степень 3), асцитию (степень 5), лейкопению (степень 1), рецидивирующие, преходящие, болезненные эритематозные, узловые поражения кожи, гнойный дерматит и опоясывающий герпес.

Терапия специфичным к изоформе, пермиссивным по отношению к контексту ингибитором TGFβ1 может вызывать менее частые и/или менее тяжелые нежелательные явления (побочные эффекты) по сравнению с терапией ингибитором JAK у пациентов с миелофиброзом, например, в отношении анемии, тромбоцитопении, нейтропении, гиперхолестеринемии, повышенной аланинтрансаминазы (АЛТ), повышенной аспартаттрансаминазы (АСТ), кровоподтеков, головокружения и головной боли, таким образом, предлагая более безопасный вариант лечения.

Предполагается, что ингибиторы передачи сигналов TGFβ1 можно применять в сочетании с одним или несколькими терапевтическими средствами для лечения миелофиброза в качестве комбинированной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе ингибитор активации TGFβ1 вводят пациентам, страдающим миелофиброзом, которые получали ингибитор JAK1, ингибитор JAK2 или ингибитор JAK1/JAK2. Согласно некоторым вариантам осуществления такие пациенты отвечают на терапию ингибитором JAK1, ингибитором JAK2 или ингибитором JAK1/JAK2, тогда как согласно другим вариантам осуществления такие пациенты плохо отвечают или не отвечают на терапию ингибитором JAK1, ингибитором JAK2 или ингибитором JAK1/JAK2. Согласно некоторым вариантам осуществления применение описанного в настоящем документе специфичного к изоформе ингибитора TGFβ1 может привести тех, кто плохо отвечает или не отвечает на терапию ингибитором JAK1, ингибитором JAK2 или терапией ингибитором JAK1/JAK2, к большей чувствительности. Согласно некоторым вариантам осуществления применение описанного в настоящем документе специфичного к изоформе ингибитора TGFβ1 может позволить снизить дозировку ингибитора JAK1, ингибитора JAK2 или ингибитора JAK1/JAK2, который все еще вызывает эквивалентную клиническую эффективность у пациентов, но при этом проявляется меньшая степень токсичности, связанной с лекарственным средством, или нежелательные явления (такие как перечисленные выше). Согласно некоторым вариантам осуществления лечение описанным в настоящем документе ингибитором активации TGFβ1, используемым в сочетании с терапией ингибитором JAK1, ингибитором JAK2 или ингибитором JAK1/JAK2, может вызывать синергические или аддитивные терапевтические эффекты у пациентов. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение описанным в настоящем документе ингибитором активации TGFβ1 может усиливать преимущества ингибитора JAK1, ингибитора JAK2 или ингибитора JAK1/JAK2 или другой терапии, применяемой для лечения миелофиброза. Согласно некоторым вариантам осуществления пациенты могут дополнительно получать терапевтическое средство для лечения анемии, связанной с миелофиброзом.

Рак.

Различные виды рака включают в себя активность TGFβ1 и могут подвергаться лечению антителами и/или композициями по настоящему изобретению. Используемый в настоящем документе термин "рак" относится к любому из различных злокачественных новообразований, характеризующихся проли-

ферацией анапластических клеток, которые имеют тенденцию проникать в окружающую ткань и метастазировать в новые участки тела, а также относится к патологическому состоянию, характеризующемуся такими злокачественными новообразованиями. Рак может быть локализованным (например, солидные опухоли) или системным. В контексте настоящего раскрытия термин "локализованный" (как в "локализованной опухоли") относится к анатомически выделенным или выделяемым нарушениям, таким как солидные злокачественные новообразования, в отличие от системного заболевания. Некоторые виды рака, такие как, например, лейкоз (например, миелофиброз) и множественная миелома, например, могут иметь как локализованный компонент (например, костный мозг), так и системный компонент (например, циркулирующие клетки крови) для заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления рак может быть системным, таким как гематологические злокачественные новообразования. Рак, который можно лечить в соответствии с настоящим изобретением, включает в себя, без ограничения, все типы лимфом/лейкозов, карцином и сарком, таких как рак или опухоли, обнаруженные в анусе, мочевом пузыре, желчном протоке, кости, головном мозге, молочной железе, шейке матки, толстой кишке/прямой кишке, эндометрии, пищеводе, глазе, желчном пузыре, голове и шее, печени, почке, гортани, легком, средостении (грудной клетке), рту, яичниках, поджелудочной железе, половом члене, простате, коже, тонкой кишке, желудке, спинном мозге, копчике, яичках, щитовидной железе и матке. При раке TGF $\beta$ 1 (например, TGF $\beta$ 1) может быть либо стимулирующим рост, либо ингибирующим рост. Например, при раке поджелудочной железы опухоли дикого типа SMAD4 могут испытывать ингибированный рост в ответ на TGF, но по мере прогрессирования заболевания, как правило, присутствует конститутивно активированный рецептор типа II. Кроме того, есть SMAD4-нулевой рак поджелудочной железы. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, их антигенсвязывающие части и/или композиции по настоящему изобретению предназначены для селективного нацеливания на компоненты сигнальных путей TGF, которые уникально функционируют при одной или нескольких формах рака. Лейкозы или рак крови или костного мозга, которые характеризуются аномальной пролиферацией белых кровяных клеток, т.е. лейкоцитов, можно разделить на четыре основные категории, включая в себя острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфолейкоз (CLL), острый миелогенный лейкоз или острый миелоидный лейкоз (AML) (AML с транслокациями между хромосомой 10 и 11 [t(10;11)], хромосомой 8 и 21 [t(8;21)], хромосомой 15 и 17 [t(15; 17)] и инверсиями в хромосоме 16 [inv(16)]; AML с многолинейной дисплазией, которая включает в себя пациентов с предшествующим миелодиспластическим синдромом (MDS) или миелопролиферативным заболеванием, которое трансформируется в AML; AML и миелодиспластический синдром (MDS), связанные с терапией, к такой категории относятся пациенты, которые ранее проходили химиотерапию и/или облучение и у которых впоследствии развились AML или MDS; d) AML, не относящиеся к другим категориям, которые включают в себя подтипы AML, которые не попадают в вышеуказанные категории; и e) острые лейкозы неоднозначного происхождения, которые возникают, когда лейкозные клетки нельзя классифицировать как миелоидные или лимфоидные клетки или когда присутствуют оба типа клеток); и хронический миелогенный лейкоз (CML).

Специфичные к изоформе, перmissive по отношению к контексту ингибиторы TGF $\beta$ 1, такие как описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения множественной миеломы. Множественная миелома представляет собой рак В-лимфоцитов (например, плазматических клеток, плазмобластов, В-клеток памяти), который развивается и расширяется в костном мозге, вызывая деструктивные повреждения кости (т.е. остеолитическое повреждение). Как правило, заболевание проявляется усиленную остеокластическую резорбцию кости, супрессированную дифференцировку остеобластов (например, задержку дифференцировки) и нарушение формирования кости, характеризующееся частично остеолитическими поражениями, остеопенией, остеопорозом, гиперкальциемией, а также плазмоцитомой, тромбоцитопенией, нейтропенией и невропатией. Описанная в настоящем документе селективная в отношении TGF $\beta$ 1, перmissive по отношению к контексту ингибиторная терапия может быть эффективной для ослабления одного или нескольких таких клинических проявлений или симптомов у пациентов. Ингибитор TGF $\beta$ 1 можно вводить пациентам, которые получают дополнительную терапию или терапию для лечения множественной миеломы, включая в себя те, которые перечислены в настоящем документе в другом месте. Согласно некоторым вариантам осуществления множественную миелому можно лечить ингибитором TGF $\beta$ 1 (таким как специфичный к изоформе, перmissive по отношению к контексту ингибитор) в комбинации с ингибитором миостатина или ингибитором IL-6. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGF $\beta$ 1 может использоваться в сочетании с традиционными способами лечения множественной миеломы, такими как бортезомиб, леналидомид, карфилзомиб, помалидомид, талидомид, доксорубицин, кортикостероиды (например, дексаметазон и преднизон), химиотерапия (например, мелфалан), лучевая терапия, трансплантация стволовых клеток, плидеспин, элутузумаб, иксазомиб, маситиниб и/или панобиностат.

Типы карцином, которые можно лечить способами по настоящему изобретению, включают в себя, без ограничения, папиллому/карциному, хориокарциному, опухоль эндодермальной пазухи, тератому, аденому/аденокарциному, меланому, фиброму, липому, лейомиому, рабдомиому, мезотелиому, ангиому, остеому, хондрому, глиому, лимфому/лейкоз, плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак, крупнокле-

точный недифференцированный рак, базальноклеточный рак и синоназальный недифференцированный рак.

Типы сарком включают в себя, без ограничения, такую саркому мягких тканей, как альвеолярная саркома мягких частей, ангиосаркома, дерматофибросаркома, десмоидная опухоль, десмопластическая мелкокруглоклеточная опухоль, внескелетная хондросаркома, внескелетная остеосаркома, фибросаркома, гемангиоперицитомы, гемангиосаркома, саркома Капоши, лейомиосаркома, липосаркома, лимфангиосаркома, лимфосаркома, злокачественная фиброзная гистиоцитома, нейрофибросаркома, рабдомиосаркома, синовиальная саркома и опухоль Аскина, саркома Юинга (примитивная нейроэктодермальная опухоль), злокачественная гемангиоэндотелиома, злокачественная шваннома, остеосаркома и хондросаркома.

Селективные в отношении изоформы, перmissive по отношению к контексту/независимые от контекста ингибиторы активации TGF $\beta$ 1, такие как описанные в настоящем документе, могут быть пригодны для лечения злокачественных новообразований, вовлекающих клетки, характеризующиеся происхождением из нервного гребня. Рак клеточной линии нервного гребня (т.е. опухоли, происходящие из нервного гребня) включает в себя, без ограничения: меланому (рак меланоцитов), нейробластому (рак предшественников симпатoadренальной системы), ганглионеврому (рак ганглиев периферической нервной системы), медуллярную карциному щитовидной железы (рак клеток щитовидной железы), феохромоцитому (рак хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников) и MPNST (рак клеток Шванна). Согласно некоторым вариантам осуществления антитела и способы по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения одного или нескольких типов рака или связанных с раком состояний, которые могут включать в себя, без ограничения, рак толстой кишки, рак почки, рак молочной железы, злокачественную меланому и глиобластому (Schlingensiepen et al., 2008; Ouhtit et al., 2013).

Все больше доказательств указывают на роль макрофагов в прогрессировании опухоли/рака. Настоящее изобретение охватывает идею о том, что это частично опосредовано активацией TGF $\beta$ 1 в окружении заболевания, такой как TME. Моноциты, происходящие из костного мозга (например, CD11b+), рекрутируются в опухолевые участки в ответ на происходящие из опухоли цитокины/хемокины, где моноциты подвергаются дифференцировке и поляризации, чтобы приобрести прораковый фенотип (например, M2-смещенные, TAM или TAM-подобные клетки). Как показано в представленных в настоящем раскрытии примерах, моноциты, выделенные из человеческих PBMC, могут индуцироваться для поляризации в различные подтипы макрофагов, например, M1 (профиброзный, противораковый) и M2 (прораковый). Большинство TAM во многих опухолях представляют собой M2-смещенные. Обнаружено, что среди M2-подобных макрофагов подтипы M2c и M2d, но не M1, экспрессируют повышенный LRRC33 на клеточной поверхности. Кроме того, макрофаги могут быть дополнительно деформированы или активированы воздействием M-CSF, что приводит к заметному увеличению экспрессии LRRC33, что совпадает с экспрессией TGF $\beta$ 1. Также наблюдалось увеличение циркулирующего M-CSF (т.е. концентрации M-CSF в сыворотке) у пациентов с миелопролиферативным заболеванием (например, миелофиброзом). Как правило, опухоли с высоким содержанием макрофагов (TAM) и/или MDSC связаны с плохим прогнозом. Аналогичным образом, повышенные уровни M-CSF также свидетельствуют о плохом прогнозе.

Как указано выше, перmissive по отношению к контексту/независимые от контекста ингибиторы активации TGF $\beta$ 1 могут быть использованы при лечении меланомы. Типы меланомы, которые можно лечить такими ингибиторами, включают в себя, без ограничения: злокачественное лентиго; меланома типа злокачественного лентиго; поверхностная распространяющаяся меланома; акральная лентигинозная меланома; меланома слизистой оболочки; узелковая меланома; полиповидная меланома и десмопластическая меланома. Согласно некоторым вариантам осуществления меланома представляет собой метастатическую меланому.

В последнее время ингибиторы иммунной контрольной точки использовались для эффективного лечения пациентов с прогрессирующей меланомой. В частности, антитела к белку запрограммированной смерти (PD)-1 (например, ниволумаб и пембролизумаб) теперь стали стандартом лечения некоторых видов рака, таких как прогрессирующая меланома, которые продемонстрировали значительную активность и длительный ответ с управляемым профилем токсичности. Однако эффективное клиническое применение антагонистов PD-1 затруднено вследствие высокого уровня врожденной резистентности (~60-70%) (смотрите Hugo et al. (2016) Cell 165: 35-44), иллюстрирующим, что продолжающиеся проблемы по-прежнему включают в себя вопросы выбора пациентов и показателей ответа и резистентности, а также оптимизации комбинированных стратегий (Perrot et al. (2013) Ann Dermatol 25(2): 135-144). Более того, исследования показали, что приблизительно у 25% пациентов с меланомой, которые первоначально ответили на анти-PD-терапию, в конечном итоге развивалась приобретенная резистентность (Ribas et al. (2016) JAMA 315: 1600-9).

Число опухолевых инфильтрирующих CD8+ Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и/или CTLA-4, по-видимому, является ключевым индикатором успеха с ингибированием контрольной точки, и блокада как PD-1, так и CTLA-4 может увеличить инфильтрирующие Т-клетки. Однако у пациентов с более высокой инфильтрацией макрофагов противораковые эффекты клеток CD8 могут быть супрессированы.

Предполагается, что экспрессирующие LRRC33 клетки, такие как миелоидные клетки, включая в

себя миелоидные предшественники, MDSC и TAM, могут создавать или поддерживать иммуносупрессивное окружение (такое как TME и миелофиброзный костный мозг) путем ингибирования Т-клеток (например, истощения Т-клеток), такие как CD4 и/или CD8 Т-клетки, которые могут, по меньшей мере частично, подчеркивать наблюдаемое сопротивление анти-PD-1 в определенных популяциях пациентов. В самом деле, данные свидетельствуют о том, что резистентность к анти-PD-1 монотерапии была отмечена неспособностью накапливать цитотоксические CD8+ Т-клетки и сниженным отношением Teff/Treg. Примечательно, что авторы настоящего изобретения признали, что существует определенная бифуркация среди некоторых больных раком пациентов, таких как популяция пациентов с меланомой, в отношении уровней экспрессии LRRC33: одна группа демонстрирует высокую экспрессию LRRC33 (LRRC33<sup>high</sup>), тогда как другая группа демонстрирует относительно низкую экспрессию LRRC33 (LRRC33<sup>low</sup>). Таким образом, настоящее изобретение включает в себя понятие о том, что популяция пациентов LRRC33<sup>high</sup> может представлять собой тех, кто плохо отвечает на иммунную терапию или резистентен к терапии ингибиторами контрольной точки. Соответственно, средства, которые ингибируют LRRC33, такие как описанные в настоящем документе, могут быть особенно применимы для лечения рака, такого как меланома, лимфома и миелопролиферативные нарушения, которые резистентны к терапии ингибитором контрольной точки (например, анти-PD-1).

Согласно некоторым вариантам осуществления рак/опухоль по своей природе резистентна или не отвечает на ингибитор иммунной контрольной точки. Чтобы привести только один пример, некоторые лимфомы, по-видимому, плохо отвечают на ингибирование иммунной контрольной точки, такое как анти-PD-1 терапия. Аналогично, подгруппа пациентов с меланомой, как известно, проявляет резистентность к ингибиторам иммунной контрольной точки. Не намереваясь ограничиваться конкретной теорией, авторы настоящего раскрытия предполагают, что это может быть, по меньшей мере частично, обусловлено активизацией сигнальных путей TGFβ1, которые могут создавать иммуносупрессивное микроокружение, в котором ингибиторы контрольной точки не способны оказывать свое влияние. Ингибирование TGFβ1 может сделать такой рак более чувствительным к терапии ингибитором контрольной точки. Неограничивающие примеры типов рака, которые могут выиграть от комбинации ингибитора иммунной контрольной точки и ингибитора TGFβ1, включают в себя: миелофиброз, меланому, почечно-клеточный рак, рак мочевого пузыря, рак толстой кишки, гематологические злокачественные новообразования, немелкоклеточную карциному, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), лимфому (классическую ходжкинскую и неходжкинскую), рак головы и шеи, рак уротелия, рак с высокой нестабильностью микросателлитов, рак с дефицитом репарации ошибочно спаренных оснований, рак желудка, рак почки и гепатоцеллюлярный рак. Однако любой рак (например, у пациентов с таким раком), в котором TGFβ1 сверхэкспрессирован или является доминантной изоформой по сравнению с TGFβ2/3, как определено, например, биопсией, можно подвергать лечению селективным в отношении изоформы ингибитором TGFβ1 в соответствии с настоящим раскрытием.

Согласно некоторым вариантам осуществления рак/опухоль становятся резистентными со временем. Это явление называется приобретенной резистентностью или адаптивной резистентностью. Подобно внутренней резистентности, согласно некоторым вариантам осуществления приобретенная резистентность по меньшей мере частично опосредуется TGFβ1-зависимыми путями. Описанные в настоящем документе специфичные к изоформе ингибиторы TGFβ1 могут быть эффективными в восстановлении противоракового иммунитета в этих случаях.

Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированная терапия, содержащая ингибитор иммунной контрольной точки и ингибитор LRRC33 (такие как описанные в настоящем документе), может быть эффективной для лечения такого рака. Кроме того, высокий LRRC33-позитивный клеточный инфильтрат в опухолях или в других участках/тканях с аномальной пролиферацией клеток может служить в качестве биомаркера для иммуносупрессии хозяина и резистентности иммунной контрольной точки. Точно так же эффекторные Т-клетки могут быть исключены из иммуносупрессивной ниши, которая ограничивает способность организма бороться с раком. Более того, как показано в разделе "Примеры" ниже, Treg, которые экспрессируют TGFβ1, презентуемый GARP, супрессируют пролиферацию эффекторных Т-клеток. В общей сложности, TGFβ1, вероятно, является ключевым фактором в производстве и поддержании иммуноингибирующего микроокружения заболевания (такого как TME), и множественные континкты презентации TGFβ1 важны для опухолей. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинационная терапия может достигать более благоприятных соотношений Teff/Treg.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, как описано в настоящем документе, могут быть использованы в способах лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, причем указанный способ предусматривает введение антитела или его антигенсвязывающей части субъекту таким образом, что рак подвергается лечению. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой рак толстой кишки.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, кото-

рые специфично связываются с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, как описано в настоящем документе, могут быть использованы в способах лечения солидных опухолей. Согласно некоторым вариантам осуществления солидные опухоли могут представлять собой десмопластические опухоли, которые, как правило, являются плотными и трудными для проникновения терапевтических молекул. Посредством нацеливания на компонент ECM таких опухолей такие антитела могут "ослаблять" плотную опухолевую ткань для дезинтеграции, облегчая терапевтический доступ для проявления его противораковых эффектов. Таким образом, дополнительные терапевтические средства, такие как любые известные противоопухолевые лекарственные средства, могут быть использованы в комбинации.

Дополнительно или в качестве альтернативы, специфичные к изоформе, пермиссивные по отношению к контексту антитела или их фрагменты, которые способны ингибировать активацию TGF $\beta$ 1, такие как описанные в настоящем документе, могут использоваться в сочетании с технологией Т-клеток с химерными антигенными рецепторами ("CAR-T") в качестве клеточной иммунотерапии, например, иммунотерапии рака для борьбы с раком.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, как описано в настоящем документе, могут использоваться в способах ингибирования или уменьшения роста солидной опухоли у субъекта, характеризующегося наличием солидной опухоли, причем указанный способ предусматривает введение антитела или его антигенсвязывающей части субъекту таким образом, что рост солидной опухоли ингибируется или уменьшается. Согласно определенным вариантам осуществления солидная опухоль представляет собой карциному толстой кишки. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, используемые для лечения рака, представляют собой специфичный к изоформе, пермиссивный по отношению к контексту ингибитор активации TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие антитела нацелены на комплекс GARP-TGF $\beta$ 1, комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1 и комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие антитела нацелены на комплекс GARP-TGF $\beta$ 1, комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1 и комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие антитела нацелены на комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1 и комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие антитела нацелены на комплекс GARP-TGF $\beta$ 1 и комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1.

Настоящее изобретение включает в себя применение пермиссивных по отношению к контексту (независимых от контекста) специфичных к изоформе ингибиторов TGF $\beta$ 1 при лечении рака, содержащего солидную опухоль, у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления такой пермиссивный по отношению к контексту (независимый от контекста), специфичный к изоформе ингибитор может ингибировать активацию TGF $\beta$ 1. Согласно предпочтительным вариантам осуществления такой ингибитор активации представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, которая связывается с комплексом про-TGF $\beta$ 1. Связывание может происходить, когда комплекс ассоциирован с любой из презентующих молекул, например, LTBP1, LTBP3, GARP или LRRC33, тем самым ингибируя высвобождение зрелого фактора роста TGF $\beta$ 1 из комплекса. Согласно некоторым вариантам осуществления солидная опухоль характеризуется наличием стромы, обогащенной CD8<sup>+</sup> Т-клетками, вступающими в прямой контакт с CAF и коллагеновыми волокнами. Такая опухоль может создавать иммуно-супрессивное окружение, которое препятствует эффективной инфильтрации опухоли противоопухолевым иммунным клеткам (например, эффекторным Т-клеткам), ограничивая способность организма бороться с раком. Вместо этого такие клетки могут накапливаться внутри или вблизи стромы опухоли. Эти признаки могут сделать такие опухоли плохо отвечающими на терапию ингибитором иммунной контрольной точки. Как более подробно обсуждается ниже, раскрытые в настоящем документе ингибиторы TGF $\beta$ 1 могут разблокировать супрессию, чтобы позволить эффекторным клеткам достигать и уничтожать раковые клетки, например, используемые в сочетании с ингибитором иммунной контрольной точки.

Предполагается, что TGF $\beta$ 1 играет многогранную роль в опухолевом микроокружении, включая в себя рост опухоли, супрессию иммунитета хозяина, пролиферацию злокачественных клеток, васкуляризацию, ангиогенез, миграцию, инвазию, метастазирование и резистентность к химиотерапии. Следовательно, каждый "контекст" презентации TGF $\beta$ 1 в окружении может участвовать в регуляции (или дисрегуляции) прогрессирования заболевания. Например, ось GARP особенно важна в ответе Treg, который регулирует ответ эффекторных Т-клеток для обеспечения иммунного ответа хозяина для борьбы с раковыми клетками. Ось LTBP1/3 может регулировать ECM, включая в себя строму, где связанные с раком фибробласты (CAF) играют роль в патогенезе и прогрессировании рака. Ось LRRC33 может играть решающую роль в рекрутинге циркулирующих моноцитов в опухолевое микроокружение, последующей дифференцировке в опухолеассоциированные макрофаги (TAM), инфильтрацию в ткань опухоли и обострение заболевания.

Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессирующие TGF $\beta$ 1 клетки проникают в опу-

холь, создавая иммуносупрессивное локальное окружение. Степень, в которой наблюдается такая инфильтрация, может коррелировать с худшим прогнозом. Согласно некоторым вариантам осуществления более высокая инфильтрация указывает на более слабый ответ на лечение другой терапией рака, такой как ингибиторы иммунной контрольной точки. Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессирующие TGF $\beta$ 1 клетки в опухолевом микроокружении содержат Treg и/или миелоидные клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления миелоидные клетки включают в себя, без ограничения: макрофаги, моноциты (тканевые резидентные или происходящие из костного мозга) и MDSC.

Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессирующие LRRC33 клетки в TME являются миелоидными клетками-супрессорами (MDSC). Инфильтрация MDSC (например, инфильтрация солидной опухоли) может подчеркивать по меньшей мере один механизм ускользания от иммунного ответа путем создания иммуносупрессивной ниши, из которой исключаются противоопухолевые иммунные клетки хозяина. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что MDSC мобилизуются связанными с воспалением сигналами, такими как опухолеассоциированные воспалительные факторы, Ороп мобилизация, MDSC могут влиять на иммуносупрессивные эффекты путем повреждения клеток, борющихся с заболеваниями, таких как CD8+ Т-клетки и NK-клетки. Кроме того, MDSC могут индуцировать дифференцировку Treg путем секреции TGF $\beta$  и IL-10. Таким образом, специфичный к изоформе, пермиссивный по отношению к контексту ингибитор TGF $\beta$ 1, такой как описанные в настоящем документе, может вводиться пациентам с уклонением от иммунного ответа (например, нарушенным иммунологическим надзором), чтобы восстановить или повысить способность организма бороться с заболеванием (таким как опухоль). Как описано более подробно в настоящем документе, это может дополнительно усиливать (например, восстанавливать или активизировать) чувствительность организма или чувствительность к другой терапии, такой как терапия рака.

Согласно некоторым вариантам осуществления повышенная частота (например, количество) циркулирующих MDSC у пациентов представляет собой прогнозирующие факторы слабой отвечаемости на терапию блокады контрольных точек, такой как антагонисты PD-1 и антагонисты PD-L1. Например, исследования биомаркеров показали, что циркулирующие до лечения HLA-DR lo/CD14+/CD11b+ миелоидные клетки-супрессоры (MDSC) были связаны с прогрессированием и ухудшением OS ( $p = 0,0001$  и  $0,0009$ ). Кроме того, резистентность к блокаде контрольной точки PD-1 при воспалительной карциноме головы и шеи (HNC) ассоциируется с экспрессией маркеров GM-CSF и супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC). Это наблюдение показало, что стратегии истощения MDSC, такие как химиотерапия, следует рассматривать в комбинации или последовательно с анти-PD-1. Комплексы LRRC33 или LRRC33-TGF $\beta$  представляют собой новую мишень для иммунотерапии рака благодаря селективной экспрессии на иммуносупрессивных миелоидных клетках. Следовательно, не имея намерения ограничиваться какой-либо конкретной теорией, нацеливание на этот комплекс может повысить эффективность терапии ингибиторами контрольных точек стандартной медицинской помощи в популяции пациентов.

Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрено применение описанного в настоящем документе специфичного к изоформе, пермиссивного по отношению к контексту или независимого от контекста ингибитора TGF $\beta$ 1, для лечения рака, который содержит солидную опухоль. Такое лечение предусматривает введение специфичного к изоформе, пермиссивного по отношению к контексту или независимого от контекста ингибитора TGF $\beta$ 1 субъекту, у которого диагностирован рак, который включает в себя по меньшей мере одну локализованную опухоль (солидную опухоль) в количестве, эффективном для лечения рака.

Данные свидетельствуют о том, что прогрессирование рака (например, пролиферация/рост опухоли, инвазия, ангиогенез и метастазирование) может быть, по меньшей мере частично, обусловлено взаимодействием опухоли и стромы. В частности, CAF могут способствовать этому процессу путем секреции различных цитокинов и факторов роста и ремоделирования ECM. Факторы, участвующие в процессе, включают в себя, без ограничения, происходящий из стромальных клеток фактор 1 (SCD-1), MMP2, MMP9, MMP3, MMP-13, TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, VEGF, IL-6, M-CSF. Кроме того, CAF могут рекрутировать TAM, секретирова такие факторы, как CCL2/MCP-1 и SDF-1/CXCL12, в локализации опухоли; впоследствии создается ниша про-TAM (например, обогащенные гиалуронатом стромальные области), где TAM преимущественно прикрепляются. Поскольку было высказано предположение, что TGF $\beta$ 1 способствует активации нормальных фибробластов в миофибробластоподобные CAF, введение специфичного к изоформе, пермиссивного по отношению к контексту или независимого от контекста ингибитора TGF $\beta$ 1, такого как описанные в настоящем документе, может быть эффективным для противодействия стимулирующей рак активации CAF. Действительно, данные, представленные в настоящем документе, позволяют предположить, что специфичное к изоформе, независимое от контекста антитело, которое блокирует активацию TGF $\beta$ 1, может ингибировать индуцируемую UUO активацию генов-продуцентов, таких как CCL2/MCP-1,  $\alpha$ -SMA, FN1 и Col1, которые также вовлечены во многие виды рака.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, как описано в настоящем документе, вводят субъекту,

страдающему от рака или опухоли, отдельно или в комбинации с дополнительным средством, например, антителом к PD-1 (например, антагонистом к PD-1). Другие комбинированные терапии, которые включены в настоящее изобретение, представляют собой введение антитела или его антигенсвязывающей части, описанной в настоящем документе, с помощью облучения или химиотерапевтического средства. Иллюстративные дополнительные средства включают в себя, без ограничения, антагонист PD-1, антагонист PDL1, слитый белок PD-L1 или PDL2, антагонист CTLA4, агонист GITR, антитело к ICOS, антитело к ICOSL, антитело к B7H3, антитело к B7H4, антитело к TIM3, антитело к LAG3, антитело к OX40, антитело к CD27, антитело к CD70, антитело к CD47, антитело к 41BB, антитело к PD-1, антитело к CD20, онколитический вирус и ингибитор PARP.

Согласно некоторым вариантам осуществления определение или выбор терапевтического подхода для комбинированной терапии, который подходит для определенных типов рака или популяции пациентов, может предусматривать следующее: а) соображения относительно типов рака, для которых доступна стандартная терапия (например, утвержденные иммунотерапией показания); б) соображения относительно резистентных к лечению субпопуляций; и с) соображения относительно видов рака/опухолей, которые являются "активными в отношении пути TGFβ1" или иным образом, по меньшей мере частично, зависимыми от TGFβ1 (например, чувствительными к ингибированию TGFβ1). Например, многие образцы рака показывают, что TGFβ1 является преобладающей изоформой, например, анализом TCGA RNAseq. Согласно некоторым вариантам осуществления более 50% (например, более 50%, 60%, 70%, 80% и 90%) образцов от каждого типа опухоли являются положительными по экспрессии изоформы TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления виды рака/опухоли, которые являются "активными в отношении пути TGFβ1" или иным образом, по меньшей мере частично, зависимыми от TGFβ1 (например, чувствительными к ингибированию TGFβ1), содержат по меньшей мере одну мутацию Ras, такую как мутации в K-ras, N-ras и/или H-ras. Согласно некоторым вариантам осуществления рак/опухоль содержит по меньшей мере одну мутацию K-ras.

Согласно некоторым вариантам осуществления специфичный к изоформе, перmissiveный по отношению к контексту ингибитор TGFβ1 вводят в сочетании с терапией, ингибирующей контрольную точку, пациентам, у которых диагностирован рак, для которых одобрена одна или несколько терапий ингибитором контрольной точки. Они включают в себя, без ограничения: уротелиальный рак мочевого пузыря, плоскоклеточную карциному (такую как головы и шеи), светлоклеточную карциному почки, карциному папиллярных клеток почки, гепато-целлюлярную карциному печени, аденокарциному легкого, кожную меланому и аденокарциному желудка. Согласно предпочтительным вариантам осуществления такие пациенты плохо отвечают или не отвечают на терапию ингибитором контрольной точки.

Роль TGFβ в условиях костно-мышечной системы.

В костно-мышечной системе, которая состоит из костей скелета, мышц, хряща, сухожилий, связок, суставов и других соединительных тканей, которые поддерживают и связывают ткани и органы вместе, TGFβ играет различные роли, включая в себя ингибирование пролиферации и дифференцировки, индукция атрофии и развитие фиброза. TGFβ уменьшает пролиферацию сателлитных клеток и предотвращает дифференцировку (посредством ингибирования MyoD и миогенина) (Allen, R.E. and L.K. *J Cell Physiol*, 1987. 133(3): p. 567-72; Brennan, T.J., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991. 88(9): p. 3822-6; Massague, J., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986. 83(21): p. 8206-10; Olson, E.N., et al., *J Cell Biol*, 1986. 103(5): p. 1799-805). Изоформа TGFβ (т.е. TGFβ1, 2 или 3) не указана в этих ранних статьях, но предполагается, что она представляет собой TGFβ1. TGFβ также способствует мышечному фиброзу; прямая инъекция рекомбинантного TGFβ1 приводит к фиброзу скелетных мышц, а ингибирование пан-TGFβ уменьшает фиброз при остром и хроническом повреждении мышц (Li, Y., et al., *Am J Pathol*, 2004. 164(3): p. 1007-19; Mendias, C.L., et al., *Muscle Nerve*, 2012. 45(1): p. 55-9; Nelson, C.A., et al., *Am J Pathol*, 2011. 178(6): p. 2611-21). TGFβ1 экспрессируется мышечными волокнами, макрофагами, регуляторными Т-клетками, фибробластами и фиброцитами в скелетной мышце (Li, Y., et al., *Am J Pathol*, 2004. 164(3): p. 1007-19; Lemos, D.R., et al., *Nat Med*, 2015. 21(7): p. 786-94; Villalta, S.A., et al., *Sci Transl Med*, 2014. 6(258): p. 258ral42; Wang, X., et al., *J Immunol*, 2016. 197(12): p. 4750-4761); и экспрессия увеличивается при травме и заболевании (Li, Y., et al., *Am J Pathol*, 2004. 164(3): p. 1007-19; Nelson, C.A., et al., *Am J Pathol*, 2011. 178(6): p. 2611-21; Bernasconi, P., et al., *J Clin Invest*, 1995. 96(2): p. 1137-44; Ishitobi, M., et al., *Neuroreport*, 2000. 11(18): p. 4033-5). TGFβ2 и TGFβ3 также активируются (на уровне мРНК) в мышцах mdx, хотя и в меньшей степени, чем TGFβ1 (Nelson, C.A., et al., *Am J Pathol*, 2011. 178(6): p. 2611-21; Zhou, L., et al., *Neuromuscul Disord*, 2006. 16(1): p. 32-8). Pessina с соавт. недавно использовали эксперименты по отслеживанию клеточных линий, чтобы показать, что клетки множественного происхождения в дистрофических мышцах принимают фиброгенную судьбу через TGFβ-зависимый путь (Pessina, P., et al., *Stem Cell Reports*, 2015. 4(6): p. 1046-60).

Кость является крупнейшим хранилищем TGFβ в организме. Действительно, считается, что путь TGFβ играет важную роль в гомеостазе и ремоделировании костей, по меньшей мере частично, путем регуляции дифференцировки остеобластов и/или резорбции остеокластов. Этот процесс вовлечен как в

нормальные, так и в аномальные ситуации, которые, будучи нерегулируемыми, могут вызвать или усугубить заболевание, такое как связанные с костями состояния и рак. Таким образом, селективные в отношении TGF $\beta$ 1 ингибиторы, такие как описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения таких состояний. Согласно некоторым вариантам осуществления введение таких ингибиторов эффективно для восстановления или нормализации костеобразования-резорбционного баланса. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGF $\beta$ 1 вводят субъектам в сочетании с другой терапией, такой как ингибитор миостатина и/или усиливающие кость средства в качестве комбинированной терапии.

Состояния костей (например, заболевания скелета) включают в себя остеопороз, дисплазию и рак кости. В дополнение к первичному раку кости, который возникает в кости, известно, что многие злокачественные новообразования метастазируют в кости; к ним относятся, без ограничения, рак молочной железы, рак легкого (например, плоскоклеточный рак), рак щитовидной железы, рак яичка, почечно-клеточный рак, рак простаты и множественная миелома.

Согласно некоторым вариантам осуществления такие состояния связаны с мышечной слабостью.

TGF $\beta$ 1 может играть роль при фиброзных состояниях, сопровождающих хроническое воспаление пораженной ткани, таких как мышечные дистрофии человека. Мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) представляет собой тяжелое, прогрессирующее и в конечном итоге смертельное заболевание, вызванное отсутствием дистрофина (Bushby, K., et al., *Lancet Neurol*, 2010. 9(1): p. 77-93). Недостаток дистрофина приводит к повышенной восприимчивости к вызванному сокращением повреждениям, что приводит к постоянной дегенерации мышц (Petrof, B.J., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993. 90(8): p. 3710-4; Dello Russo, C., et al., *J Muscle Res Cell Motil*, 2001. 22(5): p. 467-75; Pratt, S.J., et al., *Cell Mol Life Sci*, 2015. 72(1): p. 153-64). Повторные циклы восстановления способствуют хроническому воспалению, фиброзу, истощению пула сателлитных клеток, возможной потере подвижности и смерти (Bushby, K., et al., *Lancet Neurol*, 2010. 9(1): p. 77-93; McDonald, C.M., et al., *Muscle Nerve*, 2013. 48(3): p. 343-56). Экспрессия TGF $\beta$ 1 значительно увеличивается у пациентов с DMD и коррелирует со степенью фиброза, наблюдаемой у этих пациентов (Bernasconi, P., et al., *J Clin Invest*, 1995. 96(2): p. 1137-44; Chen, Y.W., et al., *Neurology*, 2005. 65(6): p. 826-34). Чрезмерное отложение ECM оказывает пагубное влияние на сократительные свойства мышц и может ограничивать доступ к питанию, поскольку миофибриллы изолированы от их кровоснабжения (Klingler, W., et al., *Acta Myol*, 2012. 31(3): p. 184-95). В последнее время дополнительные данные дополнительно указывают на наличие TGF $\beta$ 1 при мышечной дистрофии. Было обнаружено, что варианты в LTBP4 модифицируют тяжесть заболевания у мышей и человека. У мышей вариант LTBP4 является защитным у тех мышей, у которых отсутствует дистрофин или у-саркогликан (Coley, W.D., et al., *Hum Mol Genet*, 2016. 25(1): p. 130-45; Heydemann, A., et al., *J Clin Invest*, 2009. 119(12): p. 3703-12). У людей две группы независимо друг от друга определили вариант LTBP4 как защитный при DMD, задерживающий потерю способности передвигаться на несколько лет (Flanigan, K.M., et al., *Ann Neurol*, 2013. 73(4): p. 481-8; van den Bergen, J.C., et al., *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2015. 86(10): p. 1060-5). Хотя природа генетических вариантов у мышей и человека различна, у обоих видов защитный вариант приводит к снижению передачи сигналов TGF $\beta$  (Heydemann, A., et al., *J Clin Invest*, 2009. 119(12): p. 3703-12; Ceco, E., et al., *Sci Transl Med*, 2014. 6(259): p. 259ra144). Многие функции TGF $\beta$ 1 в биологии скелетных мышц были выведены из экспериментов, в которых очищенный активный фактор роста вводили животным или добавляли в клетки в культуре (Massague, J., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986. 83(21): p. 8206-10; Li, Y., et al., *Am J Pathol*, 2004. 164(3): p. 1007-19; Mendias, C.L., et al., *Muscle Nerve*, 2012. 45(1): p. 55-9). Учитывая важность клеточного контекста для специфичных функций TGF $\beta$ 1 (смотрите, например, Hinck et al., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*, 2016. 8(12)), возможно, что некоторые эффекты, наблюдаемые в этих экспериментах, не отражают эндогенную роль(и) цитокина *in vivo*. Например, воздействие на дермальные фибробласты человека рекомбинантным TGF $\beta$ 1, миостатином или GDF11 приводит к почти идентичным изменениям в экспрессии генов в этих клетках, хотя роли этих белков *in vivo* довольно различны (Tanner, J.W., Khalil, A., Hill, J., Franti, M., MacDonnell, S.M., *Growth Differentiation Factor 11 Potentiates Myofibroblast Activation, in Fibrosis: From Basic Mechanisms to Targeted therapies*. 2016: Keystone, CO).

Многочисленные исследователи использовали ингибиторы TGF для выяснения роли фактора роста *in vivo*. Лечение мышей mdx пан-TGF $\beta$ -нейтрализующим антителом 1D11 явно приводит к снижению фиброза (посредством гистологии и гидроксипролинового содержания), снижению мышечного повреждения (снижение креатинкиназы в сыворотке и большей плотности миофибрилл) и улучшению мышечной функции (с помощью плетизмографии, генерации силы выделенных мышц EDL и повышенной силе захвата передних конечностей) (Nelson, C.A., et al., *Am J Pathol*, 2011. 178(6): p. 2611-21; Andreetta, F., et al., *J Neuroimmunol*, 2006. 175(1-2): p. 77-86; Gumucio, J.P., et al., *J Appl Physiol* (1985), 2013. 115(4): p. 539-45). Кроме того, специфичная к мышечному волокну экспрессия доминантно-негативного рецептора TGF $\beta$  типа II защищает от повреждения мышц после повреждения кардиотоксином и у мышей с 5-саркогликаном/- (Accornero, F., et al., *Hum Mol Genet*, 2014. 23(25): p. 6903-15). Протеогликан декорин, который в избытке присутствует в скелетных мышцах и ингибирует активность TGF $\beta$ , уменьшает мы-

шечный фиброз у мышей mdx и после повреждения в виде рваной раны (Li, Y., et al., *Mol Ther*, 2007. 15(9): p. 1616-22; Gosselin, L.E., et al., *Muscle Nerve*, 2004. 30(5): p. 645-53). Другие молекулы с ингибирующей TGF $\beta$  активностью, такие как сурамин (противоопухолевое средство) и лозартан (блокатор рецепторов ангиотензина), были эффективны в улучшении мышечной патологии и уменьшении фиброза на мышинной модели повреждения, синдроме Марфана и мышечной дистрофии (Spurney, C.F., et al., *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2011. 16(1): p. 87-95; Taniguti, A.P., et al., *Muscle Nerve*, 2011. 43(1): p. 82-7; Bedair, H.S., et al., *Am J Sports Med*, 2008. 36(8): p. 1548-54; Cohn, R.D., et al., *Nat Med*, 2007. 13(2): p. 204-10). Хотя все описанные выше терапевтические средства ингибируют TGF $\beta$ 1 или его передачу сигналов, ни один из них не является специфичным к изоформе TGF $\beta$ 1. Например, 1D11 связывает и ингибирует изоформы TGF $\beta$ 1, 2 и 3 (Dasch, J.R., et al., *J Immunol*, 1989. 142(5): p. 1536-41). Сурамин ингибирует способность множественных факторов роста связываться со своими рецепторами, включая в себя PDGF, FGF и EGF, в дополнение к TGF $\beta$ 1 (Hosang, M., *J Cell Biochem*, 1985. 29(3): p. 265-73; Olivier, S., et al., *Eur J Cancer*, 1990. 26(8): p. 867-71; Scher, H.I. and W.D. Heston, *Cancer Treat Res*, 1992. 59: p. 131-51). Декорин также ингибирует активность миостатина как посредством прямого связывания, так и посредством активизации фоллистатина, ингибитора миостатина (Miura, T., et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 340(2): p. 675-80; Brandan, E., C Cabello-Verrugio, and C Vial, *Matrix Biol*, 2008. 27(8): p. 700-8; Zhu, J., et al., *J Biol Chem*, 2007. 282(35): p. 25852-63). Лозартан влияет на дополнительные сигнальные пути, воздействуя на систему ренин-ангиотензин-альдостерон, включая в себя путь IGF-1/AKT/mTOR (Burks, T.N., et al., *Sci Transl Med*, 2011. 3(82): p. 82ra37; Sabharwal, R. and M.W. Chapleau, *Exp Physiol*, 2014. 99(4): p. 627-31; McIntyre, M., et al., *Pharmacol Ther*, 1997. 74(2): p. 181-94). Следовательно, все эти способы лечения ингибируют дополнительные молекулы, которые могут способствовать их терапевтическому эффекту, а также токсичности.

Учитывая предполагаемую роль TGF $\beta$  в гомеостазе, репарации и регенерации мышц, такие средства, как описанные в настоящем документе моноклональные антитела, которые селективно модулируют передачу сигналов TGF $\beta$ 1, могут быть эффективными для лечения поврежденных мышечных волокон, таких как при хронических/генетических мышечных дистрофиях и острых мышечных повреждениях, без токсичности, связанной с более широко действующими ингибиторами TGF $\beta$ , разработанными до настоящего времени.

Соответственно, в настоящем изобретении представлены способы лечения поврежденных мышечных волокон с использованием средства, которое преимущественно модулирует подгруппу, но не все, эффекты TGF $\beta$  in vivo. Такие средства могут селективно модулировать передачу сигналов TGF $\beta$ 1 ("специфичная к изоформе модуляция").

Восстановление мышечного волокна при хронических мышечных заболеваниях: Настоящее изобретение охватывает способы улучшения качества мышц и их функции у пациентов с DMD путем ограничения фиброза и содействия нормализации морфологии и функций мышц. Поскольку TGF $\beta$ 1 также ингибирует миогенез, блокада TGF $\beta$ 1 может способствовать регенерации в дистрофических мышцах, добавляя дополнительное терапевтическое преимущество. Ингибиторы TGF $\beta$ 1 можно использовать в сочетании с регулирующей дистрофины терапией, такой как Exondys 51 (Eteplirsen). Учитывая потенциальные терапевтические преимущества ингибирования TGF $\beta$ 1 при мышечной дистрофии, крайне важно (1) дифференцировать роль(и) TGF $\beta$ 1 от ролей TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3 и (2) прояснить, в каком молекулярном контексте(ах) ингибирование TGF $\beta$ 1 будет самым выгодным. Как указано выше, ингибиторы пан-TGF $\beta$  были связаны со значительной токсичностью, ограничивая клиническое применение этих соединений (Anderton, M.J., et al., *Toxicol Pathol*, 2011. 39(6): p. 916-24; Stauber, A., et al., *Clinical Toxicology*, 2014. 4(3):

p. 1-10). Неясно, какая из изоформ TGF $\beta$  вызывает эти токсичности. Некоторые из описанных токсичностей могут быть связаны с ингибированием TGF $\beta$ 1 в иммунной системе. Например, в то время как 1D11 значительно снижал уровни фиброза в диафрагме, лечение также увеличивало количество CD4+ и CD8+ Т-клеток в мышцах, что свидетельствует об увеличенном воспалительном ответе при ингибировании пан-TGF $\beta$ , который может быть вредным при длительном лечении (Andreetta, F., et al., *J Neuroimmunol*, 2006. 175(1-2): p. 77-86). Действительно, истощение Т-клеток из мышц улучшает мышечную патологию у мышей mdx, что позволяет предположить, что опосредованные Т-клетками воспалительные ответы вредны для дистрофической мышцы (Spencer, M.J., et al., *Clin Immunol*, 2001. 98(2): p. 235-43). Увеличение количества Т-клеток при введении 1D11, вероятно, связано с влиянием TGF $\beta$ 1 на регуляторные Т-клетки (Treg). Treg презентруют TGF $\beta$ 1 на своей клеточной поверхности через GARP, и высвобождение TGF $\beta$ 1 из этого комплекса усиливает Treg-супрессивную активность, таким образом ограничивая опосредованное Т-клетками воспаление (Wang, R., et al., *Mol Biol Cell*, 2012. 23(6): p. 1129-39; Edwards, J.P., A.M. Thornton, and E.M. Shevach, *J Immunol*, 2014. 193(6): p. 2843-9; Nakamura, K., et al., *J Immunol*, 2004. 172(2): p. 834-42; Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *J Exp Med*, 2001. 194(5): p. 629-44). Действительно, истощение Treg с использованием антитела PC61 приводило к усилению воспаления и повреждению мышц в диафрагме мышей mdx, тогда как увеличение числа Treg и активности уменьшало повре-

ждение мышц (Villalta, S.A., et al., *Sci Transl Med*, 2014. 6(258): p. 258ra142). Интересно, что недавно была идентифицирована дополнительная популяция иммуносупрессивных Т-клеток, Tr1-клетки. Эти клетки производят большие количества TGF $\beta$ 3, что необходимо для их супрессивной активности (Gagliani, N., et al., *Nat Med*, 2013. 19(6): p. 739-46; Okamura, T., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009. 106(33): p. 13974-9; Okamura, T., et al., *Nat Commun*, 2015. 6: p. 6329). Хотя роль клеток Tr1 в скелетных мышцах неизвестна, существует вероятность, что ингибирование как TGF $\beta$ 1, так и TGF $\beta$ 3 1D11 может оказывать аддитивное провоспалительное действие, ингибируя клетки Treg и Tr1.

Структурные идеи, описанные выше относительно латентности и активации TGF $\beta$ 1, позволяют применять новые подходы к открытию лекарственных средств, которые специфично нацелены на активацию TGF $\beta$ 1 (Shi, M., et al., *Nature*, 2011. 474(7351): p. 343-9). Высокая степень идентичности последовательностей, общих для трех зрелых факторов роста TGF $\beta$ , не является общей для латентных комплексов, что позволяет обнаруживать антитела, которые исключительно специфичны к про-TGF $\beta$ 1. Используя собственные подходы к обнаружению антител, авторы настоящего изобретения идентифицировали антитела (Ab1, Ab2 и Ab3), которые специфично связываются с про-TGF $\beta$ 1 (смотрите, например, фиг. 4B). С использованием системы совместного культивирования *in vitro* было продемонстрировано, что эти антитела ингибируют опосредованное интегрином высвобождение TGF $\beta$ 1. В этой системе фибробласты, полученные из человеческой кожи или скелетных мышц мыши, являются источником латентного TGF $\beta$ 1, клеточная линия, экспрессирующая  $\alpha$ V $\beta$ 6, позволяет высвобождать активный TGF $\beta$ 1, который затем измеряется с использованием третьей клеточной линии, экспрессирующей репортер люциферазы, отвечающий на SMAD2/3 (фиг. 7G-7H). Одно из этих антител, Ab1, было исследовано *in vivo* и показало эффективность на мышшиной модели UUO (односторонняя обструкция мочеточника) фиброза почки. В этой модели лечение мышцей (n=10) дозой 9 мг/кг/неделю Ab1 предотвращало активацию реагирующих на TGF $\beta$ 1 генов (фиг. 12A-12J) и уменьшало степень фиброза после повреждения (путем окрашивания пикросириусом красным) (фиг. 12K). Специфичные к TGF $\beta$ 1 терапии могут характеризоваться улучшенными профилями эффективности и безопасности по сравнению с ингибиторами пан-TGF $\beta$ , что является критическим аспектом для терапевтического средства, которое будет использоваться в течение длительного времени, как в популяции DMD. Ингибирующие TGF $\beta$ 1 антитела можно использовать для определения того, обладает ли специфичное ингибирование TGF $\beta$ 1 потенциалом для лечения DMD или других заболеваний мышц и для выяснения роли TGF $\beta$ 1 в регенерации скелетных мышц.

Хронические и острые травмы мышечных волокон и выбор оптимальных терапевтических средств.

В нормальной, но регенерирующей мышце после острой травмы (такой как травматическое повреждение здоровых мышц или моторных нейронов), считается, что первоначальная инфильтрация воспалительных макрофагов необходима для очистки поврежденной ткани и выделения факторов (например, цитокинов), необходимых для активации сателлитных клеток. Впоследствии эти клетки переключаются на фенотип M2, чтобы управлять заживлением раны.

В отличие от этого, при хронических состояниях, таких как заболевания, включая в себя DMD, провоспалительные макрофаги преобладали все время, и это переключение на M2 не происходит (или по меньшей мере недостаточно эффективно), и провоспалительные макрофаги продолжают стимулировать воспаление и повреждение мышц. При DMD путь NF $\kappa$ B постоянно активен, что приводит к конститутивному воспалению. Следовательно, согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор NF $\kappa$ B можно вводить пациентам с DMD для уменьшения хронического воспаления.

Таким образом, при хронических состояниях, таких как DMD, терапевтическое внимание может быть направлено на восстановление мышц, а не на регенерацию мышц. Это связано с тем, что мышечные волокна DMD имеют дефекты, но они не разрушены, они повреждены разрывами в мембране, нарушением регуляции переходных процессов кальция и повреждением АФК из макрофагов. Для сравнения, в случае травм здоровых мышц терапевтический акцент может быть сделан на регенерацию. Например, в кардиотоксических моделях мышечные волокна убиты и должны быть восстановлены. Это моделирует процесс восстановления после травматического повреждения, такого как повреждение раздавливанием.

Данные свидетельствуют о том, что LRRC33 экспрессируется в тиогликолат-индуцированных перитонеальных макрофагах, которые характеризуются M2-подобным фенотипом (характеризующимся тем, что они экспрессируют высокие уровни аргиназы, без iNOS и высокие уровни CD206).

В ситуациях, когда LRRC33 экспрессируется главным образом на клетках M2 и когда его презентация TGF $\beta$ 1 ("контекст") важна для эффектов этих клеток для заживления ран, может быть полезно активировать опосредованный LRRC33 TGF $\beta$ 1 для стимуляции восстановления и/или миогенеза. С другой стороны, в ситуациях, когда LRRC33 также экспрессируется на провоспалительных клетках M1, тогда может быть полезно ингибировать опосредованный LRRC33 TGF $\beta$ 1, учитывая, что воспаление стимулирует фиброз, особенно в условиях дистрофии, такой как DMD. Таким образом, идентификация источника/контекста связанного с заболеванием TGF $\beta$ 1 может быть важным шагом в выборе правильного модулятора передачи сигналов TGF $\beta$ , который сообщит, какой уровень селективности следует учитывать (например, специфичные к изоформе, перmissive по отношению к контексту модуляторы TGF $\beta$ 1, или специфичные к контексту модуляторы TGF $\beta$ 1; ингибиторы или активаторы TGF $\beta$ 1 и т.д.).

Помимо хронического воспаления, отличительной чертой DMD является чрезмерный и прогрессирующий фиброз. При распространенном заболевании фиброз настолько серьезен, что фактически может изолировать отдельные мышечные волокна от их кровоснабжения. Это также изменяет сократительные свойства мышц. У пациентов-людей существует сильная корреляция между степенью позитивной регуляции TGF $\beta$ 1 и фиброзом, а также тесная связь между степенью фиброза и отрицательными исходами подвижности. Следовательно, согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы LTBP-про-TGF $\beta$ 1 можно вводить пациентам с дистрофией для предотвращения и/или уменьшения фиброза, чтобы избирательно нацеливаться на связанные с ECM эффекты TGF $\beta$ 1 при заболевании. Согласно некоторым вариантам осуществления различные описанные в настоящем документе селективные в отношении изоформы и/или контекста средства могут быть использованы для достижения ингибирования передачи сигналов TGF $\beta$ 1 для предотвращения фиброза и стимуляции миогенеза, но без нежелательного влияния на иммунную систему (например, посредством GARP или LRRC33).

Лечение, введение.

Для осуществления раскрытого в настоящем документе способа эффективное количество описанной выше фармацевтической композиции можно вводить нуждающемуся в лечении субъекту (например, человеку) подходящим путем, таким как внутривенное введение, например, в виде болюса или непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, внутримышечным, внутривнутрибрюшинным, интрацереброспинальным, подкожным, внутрисуставным, интрасиновиальным, интратекальным, оральным, ингаляционным или местным путем. Коммерчески доступные распылители для жидких составов, включая в себя струйные распылители и ультразвуковые распылители, применимы для введения. Жидкие составы можно распылять непосредственно, а лиофилизированный порошок можно распылять после восстановления. Альтернативно, антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, могут быть аэрозолизованы с использованием состава фторуглерода и ингалятора отмеренных доз или вдыхаться в виде лиофилизированного и измельченного порошка.

Подлежащий лечению описанными в настоящем документе способами субъект может представлять собой млекопитающее, более предпочтительно человека.

Млекопитающие включают в себя, без ограничения, сельскохозяйственных животных, спортивных животных, домашних животных, приматов, лошадей, собак, кошек, мышей и крыс. Субъект, который нуждается в лечении, может представлять собой пациента-человека, характеризующегося риском наличия связанного с TGF $\beta$  показания, такого как отмеченные выше, или имеющего подозрение на его наличие. Субъект, имеющий связанное с TGF $\beta$  показание, может быть идентифицирован с помощью обычного медицинского обследования, например, лабораторных анализов, функциональных тестов органов, КТ или УЗИ. Субъект, у которого подозревается наличие какого-либо из этих показаний, может демонстрировать один или несколько симптомов показания. Субъект, характеризующийся риском развития показания, может представлять собой субъект, характеризующийся одним или несколькими факторами риска развития этого показания.

Используемые в настоящем документе термины "эффективное количество" и "эффективная доза" относятся к любому количеству или дозе соединения или композиции, которые являются достаточными для достижения предполагаемой цели(ей), т.е. желаемого биологического или медицинского ответа в ткани или у субъекта в приемлемом соотношении польза/риск. Например, согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения предполагаемой целью может быть ингибирование активации TGF $\beta$ -1 *in vivo* для достижения клинически значимого результата, связанного с ингибированием TGF $\beta$ -1. Эффективные количества варьируют, как это признают специалисты в настоящей области техники, в зависимости от конкретного подвергаемого лечению состояния, тяжести состояния, индивидуальных параметров пациента, включая в себя возраст, физическое состояние, размер, пол и массу, продолжительность лечения, характер параллельной терапии (если таковая имеется), конкретного пути введения и подобных факторов в пределах знаний и опыта врача. Эти факторы хорошо известны специалистам в настоящей области техники и могут быть устранены с помощью обычных экспериментов. Как правило, предпочтительно использовать максимальную дозу отдельных компонентов или их комбинаций, т.е. самую высокую безопасную дозу в соответствии с обоснованным медицинским заключением. Специалистам в настоящей области техники должно быть понятно, однако, что пациент может настаивать на более низкой дозе или приемлемой дозе по медицинским причинам, психологическим причинам или практически по любым другим причинам.

Эмпирические соображения, такие как период полураспада, как правило, будут способствовать определению дозировки. Например, антитела, которые совместимы с иммунной системой человека, такие как гуманизированные антитела или полностью человеческие антитела, могут быть использованы для продления периода полужизни антитела и предотвращения атаки антитела иммунной системой хозяина. Частота введения может быть определена и скорректирована в течение курса терапии и, как правило, но не обязательно, основана на лечении и/или супрессии, и/или ослаблении, и/или задержке связанных с TGF показаний. Альтернативно, могут быть подходящими составы с замедленным непрерывным высво-

бождением антитела, которое специфично связывается с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1. Различные составы и устройства для достижения замедленного высвобождения будут очевидны для специалиста в настоящей области техники и находятся в пределах объема настоящего раскрытия.

В одном примере дозировки для антитела, которое специфично связывается с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, как описано в настоящем документе, могут быть определены эмпирически у индивидуумов, которые получили одно или несколько введений антитела. Индивидуумы получают дополнительные дозы антагониста. Для оценки эффективности можно использовать показатель, связанный с TGF $\beta$ . Например, способы измерения повреждения мышечного волокна, восстановления мышечных волокон, уровней воспаления в мышцах и/или уровней фиброза в мышцах хорошо известны специалисту в настоящей области техники.

Настоящее изобретение охватывает признание того, что средства, способные модулировать стадию активации TGF $\beta$  специфичным к изоформе образом, могут обеспечивать улучшенные профили безопасности при использовании в качестве лекарственного средства. Соответственно, настоящее изобретение включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связывают и ингибируют активацию TGF $\beta$ 1, но не TGF $\beta$ 2 или TGF $\beta$ 3, тем самым придавая специфичное ингибирование передаче сигналов TGF $\beta$ 1 *in vivo*, минимизируя при этом нежелательные побочные эффекты от воздействия на передачу сигналов TGF $\beta$ 2 и/или TGF $\beta$ 3.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела или их антигенсвязывающие части не токсичны при введении субъекту. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела или их антигенсвязывающие части проявляют сниженную токсичность при введении субъекту по сравнению с антителом, которое специфично связывается как с TGF $\beta$ 1, так и с TGF $\beta$ 2. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела или их антигенсвязывающие части проявляют сниженную токсичность при введении субъекту по сравнению с антителом, которое специфично связывается как с TGF $\beta$ 1, так и с TGF $\beta$ 3. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела или их антигенсвязывающие части проявляют сниженную токсичность при введении субъекту по сравнению с антителом, которое специфично связывается с TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3.

Как правило, для введения любого из описанных в настоящем документе антител начальная потенциальная доза может составлять приблизительно 2 мг/кг. Для целей настоящего раскрытия типичная суточная доза может составлять от приблизительно 0,1 мг/кг до 3 мг/кг, до 30 мг/кг, до 300 мг/кг, до 3 мг/кг, до 30 мг/кг, до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. Для повторных введений в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продолжают до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов или пока не будут достигнуты достаточные терапевтические уровни для ослабления связанного с TGF $\beta$  показания или его симптома. Иллюстративная схема применения предусматривает введение начальной дозы приблизительно 2 мг/кг с последующей еженедельной поддерживающей дозой приблизительно 1 мг/кг антитела или с последующей поддерживающей дозой приблизительно 1 мг/кг каждую вторую неделю. Однако могут быть применимы другие схемы применения в зависимости от характера фармакокинетического распада, которого желает достичь практикующий врач. Например, предполагается дозирование от одного до четырех раз в неделю. Согласно некоторым вариантам осуществления дозирование составляет от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 2 мг/кг (например, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 100 мг/кг, приблизительно 300 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг и приблизительно 2 мг/кг). Фармакокинетические эксперименты показали, что концентрация антител в сыворотке, раскрытая в настоящем документе (например, Ab2), остается стабильной в течение по меньшей мере 7 дней после введения на доклинической модели животного (например, мышинной модели). Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, эта стабильность после введения может быть преимущественной, поскольку антитело можно вводить реже, поддерживая клинически эффективную концентрацию в сыворотке у субъекта, которому вводят антитело (например, субъекта-человека). Согласно некоторым вариантам осуществления частота введения составляет один раз каждую неделю, каждые 2 недели, каждые 4 недели, каждые 5 недель, каждые 6 недель, каждые 7 недель, каждые 8 недель, каждые 9 недель или каждые 10 недель; или один раз в месяц, каждые 2 месяца или каждые 3 месяца или дольше. Прогресс этой терапии легко контролировать с помощью традиционных способов и анализов. Схема применения (включая в себя используемое антитело) может меняться со временем.

Согласно некоторым вариантам осуществления для взрослого пациента с нормальной массой могут быть введены дозы в диапазоне приблизительно от 0,3 до 5,00 мг/кг. Конкретная схема применения, например, доза, время и повторение, будет зависеть от конкретного индивидуума и истории болезни этого индивидуума, а также от свойств отдельных средств (таких как период полураспада средства и другие соответствующие соображения).

Для целей настоящего раскрытия соответствующая дозировка антитела, которое специфично связывается с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или ком-

плексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, будет зависеть от используемого конкретного антитела (или его композиции), типа и серьезности показания, вводят ли антитело в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на антагонист, а также усмотрения лечащего врача. Согласно некоторым вариантам осуществления врач будет вводить антитело, которое специфично связывается с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, до тех пор, пока не будет достигнута дозировка, которая достигает желаемого результата. Введение антитела, которое специфично связывается с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, может быть непрерывным или прерывистым, в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, является ли цель введения терапевтической или профилактической, и других факторов, известных квалифицированным специалистам. Введение антитела, которое специфично связывается с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, может быть по существу непрерывным в течение предварительно выбранного периода времени или может происходить в серии разнесенных доз, например, до, во время или после развития связанного с TGF показания.

Используемый в настоящем документе термин "лечение" относится к применению или введению композиции, включающей в себя одно или несколько активных средств, субъекту, у которого имеется связанное с TGF показание, симптом показания или предрасположенность к показанию, с целью лечения, исцеления, облегчения, ослабления, изменения, исправления, устранения, улучшения или воздействия на показание, симптом показания или предрасположенность к показанию.

Облегчение связанного с TGF $\beta$  показания с антителом, которое специфично связывается с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, включает в себя задержку развития или прогрессирования показания или уменьшение серьезности показания. Облегчение показания не обязательно требует лечебных результатов. Как используется в настоящем документе, "задержка" развития показания, связанного с TGF, означает откладывание, препятствование, замедление, торможение, стабилизацию и/или откладывание прогрессирования показания. Эта задержка может быть различной продолжительности, в зависимости от истории показания и/или подвергаемых лечению индивидуумов. Способ, который "задерживает" или облегчает развитие показания, или задерживает начало показания, представляет собой способ, который уменьшает вероятность развития одного или нескольких симптомов показания в заданный период времени и/или уменьшает степень выраженности симптомов в данный период времени, если сравнивать с неиспользованием способа. Такие сравнения, как правило, основаны на клинических исследованиях с использованием количества субъектов, достаточных для получения статистически значимого результата.

Мыши DBA2/J содержат делецию в 40 п.н. в аллеле LTBP4. Дисрегуляция ECM, с которым связан латентный TGF $\beta$ 1, может обнажить эпитоп, с которым связывается Ab1. Могут быть заболевания, при которых подвергается воздействию эпитоп, с которым связывается Ab1, и эти заболевания могут представлять собой терапевтические возможности для Ab1, если показано ингибирование TGF $\beta$ 1.

Комбинированная терапия.

Настоящее раскрытие дополнительно охватывает фармацевтические композиции и родственные способы, используемые в качестве комбинированной терапии для лечения субъектов, которые могут извлечь выгоду из ингибирования TGF $\beta$  *in vivo*. Согласно любому из этих вариантов осуществления такие субъекты могут получать комбинированную терапию, которая включает в себя первую композицию, содержащую по меньшей мере один ингибитор TGF $\beta$ , например, описанное в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающую часть, в сочетании со второй композицией, содержащей по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, предназначенное для лечения того же или частично совпадающего заболевания или клинического состояния. Первая и вторая композиции могут действовать как на одну клеточную мишень, так и на отдельные клеточные мишени. Согласно некоторым вариантам осуществления первая и вторая композиции могут лечить или облегчать одинаковый или частично совпадающий набор симптомов или аспектов заболевания или клинического состояния. Согласно некоторым вариантам осуществления первая и вторая композиции могут лечить или облегчать отдельный набор симптомов или аспектов заболевания или клинического состояния. Чтобы привести только один пример, первая композиция может лечить заболевание или состояние, связанное с передачей сигналов TGF, в то время как вторая композиция может лечить воспаление или фиброз, связанный с тем же заболеванием, и т.д. Такие комбинированные терапии можно вводить в сочетании друг с другом. Фраза "в сочетании с" в контексте комбинированной терапии означает, что терапевтические эффекты первой терапии временно и/или пространственно перекрываются с терапевтическими эффектами второй терапии у субъекта, получающего комбинированную терапию. Таким образом, комбинированная терапия может быть составлена в виде единой композиции для одновременного введения или в виде отдельных композиций для последовательного введения терапии.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления комбинированная терапия дает синергетический эффект при лечении заболевания. Термин "синергетический" относится к эффектам, которые яв-

ляются большими, чем аддитивные эффекты (например, большая эффективность) каждой монотерапии в совокупности.

Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированная терапия, содержащая описанную в настоящем документе фармацевтическую композицию, дает эффективность, которая в целом эквивалентна эффективности, получаемой при другой терапии (такой как монотерапия вторым средством), но связана с меньшим нежелательным побочным эффектом или менее тяжелой токсичностью, связанной со вторым средством, по сравнению с монотерапией второго средства. Согласно некоторым вариантам осуществления такие комбинированные терапии позволяют снизить дозировку второго средства, но сохраняют общую эффективность. Такая комбинированная терапия может быть особенно подходящей для групп пациентов, для которых требуется длительное лечение и/или с участием пациентов-детей.

Соответственно, в настоящем изобретении представлены фармацевтические композиции и способы для применения в комбинированной терапии для снижения активации белка TGF $\beta$ 1 и лечения или предотвращения заболеваний или состояний, связанных с передачей сигналов TGF $\beta$ 1, как описано в настоящем документе. Соответственно, способы или фармацевтические композиции дополнительно содержат вторую терапию. Согласно некоторым вариантам осуществления вторая терапия может быть применима при лечении или профилактике заболеваний или состояний, связанных с передачей сигналов TGF $\beta$ 1. Вторая терапия может уменьшать или лечить по меньшей мере один симптом(ы), связанный с целевым заболеванием. Первый и второй виды терапии могут оказывать свое биологическое действие с помощью сходных или не связанных между собой механизмов действия; или один или оба из первого и второго способов лечения могут оказывать свое биологическое действие посредством множества механизмов действия.

Следует понимать, что описанные в настоящем документе фармацевтические композиции могут содержать первую и вторую терапию в одном и том же фармацевтически приемлемом носителе или в другом фармацевтически приемлемом носителе для каждого описанного варианта осуществления. Кроме того, следует понимать, что первый и второй виды терапии могут вводиться одновременно или последовательно в рамках описанных вариантов осуществления.

Одно или несколько антител к TGF $\beta$  или их антигенсвязывающих частей по настоящему изобретению можно использовать в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами. Примеры дополнительных терапевтических средств, которые можно использовать с антителом к TGF $\beta$  по настоящему изобретению, включают в себя, без ограничения: модулятор представителя суперсемейства TGF $\beta$ , такой как ингибитор миостатина и ингибитор GDF11; агонист VEGF; агонист IGF1; агонист FXR; ингибитор CCR2; ингибитор CCR5; двойной ингибитор CCR2/CCR5; ингибитор лизилоксидазы-2; ингибитор ASK1; ингибитор ацетил-КоА-карбоксилазы (ACC); ингибитор киназы p38; пирфенидон; нинтеданиб; ингибитор M-CSF (например, антагонист рецептора M-CSF и нейтрализующие средства M-CSF); ингибитор MAPK (например, ингибитор Erk), агонист или антагонист иммунной контрольной точки; антагонист IL-11 и антагонист IL-6 и т.п. Другие примеры дополнительных терапевтических средств, которые можно использовать с ингибиторами TGF $\beta$ , включают в себя, без ограничения, ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), ингибитор тирозинкиназы, ингибитор Ser/Thr киназы, ингибитор двойной специфичной киназы. Согласно некоторым вариантам осуществления такое средство может представлять собой ингибитор PI3K, ингибитор PKC или ингибитор JAK.

Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор контрольной точки. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство выбирают из группы, состоящей из антагониста PD-1, антагониста PDL1, слитого белка PD-L1 или PDL2, антагониста CTLA4, агониста GITR, антитела к ICOS, антитела к ICOSL, антитела к B7H3, антитела к B7H4, антитела к TIM3, антитела к LAG3, антитела к OX40, антитела к CD27, антитела к CD70, антитела к CD47, антитела к 41BB, антитела к PD-1, онколитического вируса и ингибитора PARP.

Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство связывает молекулу костимуляции Т-клеток, такую как ингибирующую молекулу костимуляции и активирующую молекулы костимуляции. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство выбирают из группы, состоящей из антитела к CD40, антитела к CD38, антитела к KIR, антитела к CD33, антитела к CD137 и антитела к CD74.

Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительная терапия представляет собой облучение. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство представляет собой химиотерапевтическое средство. Согласно некоторым вариантам осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой таксол. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство представляет собой противовоспалительное средство. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство ингибирует процесс рекрутинга моноцитов/макрофагов и/или тканевую инфильтрацию. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор активации звездчатых клеток печени. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство представляет собой антагонист хемокинового рецептора, например, антагонисты CCR2 и антагонисты CCR5. Согласно некоторым вариантам осуществления такой антагонист хемо-

кинового рецептора представляет собой двойной специфичный антагонист, такой как антагонист CCR2/CCR5. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство, которое следует вводить в качестве комбинированной терапии, представляет собой или включает в себя представителя суперсемейства TGF $\beta$  факторов роста или их регуляторов. Согласно некоторым вариантам осуществления такое средство выбирают из модуляторов (например, ингибиторов и активаторов) GDF8/миостатина и GDF11. Согласно некоторым вариантам осуществления такое средство является ингибитором передачи сигналов GDF8/миостатин. Согласно некоторым вариантам осуществления такое средство представляет собой моноклональное антитело, которое специфично связывается с про-/латентным комплексом миостатина и блокирует активацию миостатина. Согласно некоторым вариантам осуществления моноклональное антитело, которое специфично связывается с про-/латентным комплексом миостатина и блокирует активацию миостатина, не связывается со свободным зрелым миостатином.

Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительная терапия содержит терапию CAR-T.

Такая комбинированная терапия может преимущественно использовать более низкие дозы вводимых терапевтических средств, таким образом избегая возможных токсических эффектов или осложнений, связанных с различными монотерапиями. Согласно некоторым вариантам осуществления применение описанного в настоящем документе специфичного к изоформе ингибитора TGF $\beta$ 1 может приводить к тому, кто плохо отвечает или не отвечает на терапию (например, стандарт медицинской помощи), к большей чувствительности. Согласно некоторым вариантам осуществления применение описанного в настоящем документе специфичного к изоформе ингибитора TGF $\beta$ 1 может позволить снизить дозировку терапии (например, стандарта медицинской помощи), которая все еще обеспечивает эквивалентную клиническую эффективность у пациентов, но меньшую степень токсичности или побочных эффектов, связанных с лекарственными средствами.

Ингибирование активности TGF $\beta$ 1.

Способы по настоящему раскрытию включают в себя способы ингибирования активности фактора роста TGF $\beta$ 1 в одной или нескольких биологических системах. Такие способы могут включать в себя контактирование одной или нескольких биологических систем с антителом и/или композицией по настоящему раскрытию. В некоторых случаях эти способы включают в себя изменение уровня свободного фактора роста в биологической системе (например, в нише клетки или субъекта). Антитела и/или композиции в соответствии с такими способами могут включать в себя, без ограничения, биомолекулы, включая в себя, без ограничения, рекомбинантные белки, белковые комплексы и/или антитела или их антигенные части, описанные в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления способы по настоящему раскрытию могут использоваться для уменьшения или устранения активности фактора роста, называемого в настоящем документе "способами ингибирования". Некоторые такие способы могут предусматривать удержание зрелого фактора роста в комплексе TGF $\beta$  (например, TGF $\beta$ 1, образовавшем комплекс с GARP, LTBP1, LTBP3 и/или LRRC33) и/или стимулирование повторной ассоциации фактора роста в комплекс TGF $\beta$ . В некоторых случаях способы ингибирования могут предусматривать применение антитела, которое специфично связывается с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым способам ингибирования предусмотрено одно или несколько ингибирующих антител.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, их антигенсвязывающие части и композиции по настоящему раскрытию могут быть использованы для ингибирования активации TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлен способ ингибирования активации TGF $\beta$ 1, предусматривающий воздействие на комплекс GARP-TGF $\beta$ 1, комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1 антителом, его антигенсвязывающей частью или фармацевтической композицией, описанной в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело, его антигенсвязывающая часть или фармацевтическая композиция ингибируют высвобождение зрелого TGF $\beta$ 1 из комплекса GARP-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления способ выполняется *in vitro*. Согласно некоторым вариантам осуществления способ выполняется *in vivo*. Согласно некоторым вариантам осуществления способ выполняется *ex vivo*.

Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс GARP-TGF $\beta$ 1 или комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1 присутствует на внешней поверхности клетки.

Согласно некоторым вариантам осуществления клетка, экспрессирующая комплекс GARP-TGF $\beta$ 1 или комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1, представляет собой Т-клетку, фибробласт, миофибробласт, макрофаг, моноцит, дендритную клетку, антигенпрезентирующую клетку, нейтрофил, супрессорную клетку миелоидного происхождения (MDSC), лимфоцит, тучную клетку или микроглию. Т-клетка может представлять собой регуляторную Т-клетку (например, иммуносупрессивную Т-клетку). Нейтрофил может представлять собой активированный нейтрофил. Макрофаг может представлять собой активированный (например, поляризованный) макрофаг, включая в себя профибротические и/или ассоциированные с опухолью

макрофаги (TAM), например, макрофаги подтипа M2c и подтипа M2d. Согласно некоторым вариантам осуществления макрофаги подвергаются воздействию факторов, происходящих из опухоли (например, цитокинов, факторов роста и т.д.), которые могут дополнительно индуцировать прораковые фенотипы в макрофагах. Согласно некоторым вариантам осуществления таким опухолевым фактором является CSF-1/M-CSF.

Согласно некоторым вариантам осуществления клетка, экспрессирующая комплекс GARP-TGF $\beta$ 1 или комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1, представляет собой раковую клетку, например, циркулирующие раковые клетки и опухолевые клетки.

Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1 или комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1 связан с внеклеточным матриксом (т.е. компонентами ECM). Согласно некоторым вариантам осуществления внеклеточный матрикс содержит фибриллин и/или фибронектин. Согласно некоторым вариантам осуществления внеклеточный матрикс содержит белок, содержащий мотив RGD.

LRRC33 экспрессируется в селективных типах клеток, в частности в миелоидных линиях, включая в себя моноциты и макрофаги. Моноциты происходят из предшественников в костном мозге и циркулируют в кровотоке и достигают периферических тканей. Циркулирующие моноциты могут затем мигрировать в ткани, где они становятся подверженными локальному окружению (например, тканеспецифичные, связанные с заболеваниями и т.д.), которое включает в себя панель различных факторов, таких как цитокины и хемокины, запускающих дифференцировку моноцитов в макрофаги, дендритные клетки и т.д. К ним относятся, например, альвеолярные макрофаги в легком, остеокласты в костном мозге, микроглия в ЦНС, гистиоциты в соединительной ткани, клетки Купфера в печени и макрофаги бурой жировой ткани в бурых жировых тканях. В солидной опухоли инфильтрированные макрофаги могут представлять собой опухолеассоциированные макрофаги (TAM), опухолеассоциированные нейтрофилы (TAN) и миелоидные клетки-супрессоры (MDSC) и т.д. Такие макрофаги могут активировать и/или ассоциировать с активированными фибробластами, такими как фибробласты, связанные с карциномой (или раком), и/или стромой. Таким образом, описанные в настоящем документе ингибиторы активации TGF $\beta$ 1, которые ингибируют высвобождение зрелого TGF $\beta$ 1 из LRRC33-содержащих комплексов, могут нацеливаться на любую из этих клеток, экспрессирующих LRRC33-про-TGF $\beta$ 1, на поверхности клетки.

Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1 присутствует на наружной поверхности профибротических (M2-подобных) макрофагов. Согласно некоторым вариантам осуществления профибротические (M2-подобные) макрофаги присутствуют в фиброзном микроокружении. Согласно некоторым вариантам осуществления нацеливание комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1 на наружную поверхность профибротических (M2-подобных) макрофагов обеспечивает превосходный эффект по сравнению с исключительно нацеливанием на комплексы LTBP1-TGF $\beta$ 1 и/или LTBP3-TGF $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления M2-подобные макрофаги дополнительно распределяются по множеству подтипов с различными фенотипами, такими как M2c и M2d TAM-подобные макрофаги. Согласно некоторым вариантам осуществления макрофаги могут активироваться различными факторами (например, факторами роста, хемокинами, цитокинами и молекулами ремоделирования ECM), присутствующими в микроокружении опухоли, включая в себя, без ограничения, TGF $\beta$ 1, CCL2 (MCP-1), CCL22, SDF-1/CXCL12, M-CSF (CSF-1), IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, CXCR4, VEGF, PDGF, такие регулирующие простагландины средства, как арахидоновая кислота и циклооксигеназы-2 (COX-2), белок, связанный с паратиреоидным гормоном (PTHrP), RUNX2, HIF1 $\alpha$  и металлопротеиназы. Воздействие одного или нескольких таких факторов может дополнительно привести моноциты/макрофаги к проопухолевым фенотипам. В свою очередь, эти активированные опухолеассоциированные клетки могут также способствовать накоплению и/или дифференцировке других клеток в проопухолевые клетки, например, CAF, TAN, MDSC и т.п. Стромальные клетки могут также реагировать на активацию макрофагов и влиять на ремоделирование ECM и, в конечном итоге, на васкуляризацию, инвазию и метастазирование.

Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс GARP-TGF $\beta$ 1, комплекс LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекс LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекс LRRC33-TGF $\beta$ 1 связаны с внеклеточным матриксом. Согласно некоторым вариантам осуществления внеклеточный матрикс содержит фибриллин. Согласно некоторым вариантам осуществления внеклеточный матрикс содержит белок, содержащий мотив RGD.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлен способ снижения активации белка TGF $\beta$ 1 у субъекта, предусматривающий введение субъекту антитела, его антигенсвязывающей части или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, тем самым снижая активацию белка TGF $\beta$ 1 у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта имеется фиброз или он характеризуется риском его развития. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта имеется рак или он характеризуется риском его развития. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта имеется деменция или он характеризуется риском ее развития.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела или их антигенсвязывающие части снижают супрессивную активность регуляторных T-клеток (Treg).

Наборы для применения для облегчения ассоциированных со связанным с TGF $\beta$  показанием заболеваний/нарушений.

В настоящем раскрытии также представлены наборы для применения для облегчения ассоциированных со связанными с TGF $\beta$  показаниями заболеваний/нарушений. Такие наборы могут включать в себя один или несколько контейнеров, содержащих антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, например, любой из описанных в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления набор может содержать инструкции по применению в соответствии с любым из способов, описанных в настоящем документе. Включенные инструкции могут содержать описание введения антитела или его антигенсвязывающей части, которая специфично связывается с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1 для лечения, задержания начала или облегчения целевого заболевания, как описано в настоящем документе. Набор может дополнительно содержать описание выбора индивидуума, подходящего для лечения, на основе определения того, имеется ли у этого индивидуума целевое заболевание. Согласно другим вариантам осуществления инструкции содержат описание введения антитела или его антигенсвязывающей части индивидууму, подверженному риску целевого заболевания.

Инструкции, касающиеся применения антител или их антигенсвязывающих частей, которые специфично связываются с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, как правило, содержат информацию, касающуюся дозировки, графика дозирования и пути введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут быть с единичными дозами, объемными упаковками (например, многодозовыми упаковками) или с субъединичными дозами. Инструкции, поставляемые в наборах по настоящему раскрытию, как правило, представляют собой письменные инструкции на этикетке или вкладыше в упаковку (например, лист бумаги, включенный в набор), но машиночитаемые инструкции (например, инструкции, хранящиеся на магнитном или оптическом диске для хранения) также приемлемы.

Этикетка или вкладыш в упаковку указывает, что композиция применяется для лечения, задержки начала и/или облегчения заболевания или нарушения, связанного с показанием, связанным с TGF $\beta$ . Инструкции могут быть предоставлены для осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе.

Наборы по настоящему изобретению находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает в себя, без ограничения, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и т.п. Также рассматриваются упаковки для применения в сочетании с конкретным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения (например, распылитель) или инфузионное устройство, такое как мининасос. Набор может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой мешок для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). Контейнер также может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой мешок для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере, одно активное средство в композиции представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, которое специфично связывается с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1, как описано в настоящем документе.

Наборы могут дополнительно предоставлять дополнительные компоненты, такие как буферы и интерпретирующую информацию. Как правило, набор содержит контейнер и этикетку или вкладыш(и) в упаковку на контейнере или в связанном с ним виде. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии представлены изделия, содержащие содержимое описанных выше наборов.

Анализ для обнаружения комплекса GARP-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления представленные в настоящем документе способы и композиции относятся к способу обнаружения комплекса GARP-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1 в образце, полученном от субъекта. Используемый в настоящем документе термин "субъект" относится к отдельному организму, например, отдельному млекопитающему. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой отличное от человека млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой отличного от человека примата. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой грызуна. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой овцу, козу, крупный рогатый скот, птицу, кошку или собаку. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой позвоночное, амфибию, рептилию, рыбу, насекомое, муху или нематоду. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой животное для исследования. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект является генетически модифицированным, например, генетически

модифицированный отличный от человека субъект. Субъект может быть любого пола и на любой стадии развития. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой пациента или здорового добровольца.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ обнаружения комплекса GARP-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплекса LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1 в образце, полученном от субъекта, предусматривает (а) контактирование образца с антителом, которое специфично связывается с комплексом GARP-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-TGF $\beta$ 1 и/или комплексом LRRC33-TGF $\beta$ 1 в условиях, подходящих для связывания антитела с антигеном, если присутствует антиген в образце, тем самым образуя связывающие комплексы; и (b) определение уровня антитела, связанного с антигеном (например, определение уровня связывающих комплексов).

Согласно одному варианту осуществления скрининговое исследование, в котором используются биотинилированные латентные комплексы TGF $\beta$ 1, иммобилизованные на поверхности, позволяет учитывать активацию латентного TGF $\beta$  интегринными путем предоставления связи. Другие, неинтегриновые активаторы также могут быть исследованы в этой системе. Считывание может быть через репортерные клетки или другие TGF $\beta$ -зависимые клеточные ответы.

Исследования на клетках для измерения активации TGF $\beta$ .

Активация TGF $\beta$  (и ее ингибирование тест-ингибитором TGF $\beta$ , таким как антитело) может быть измерена любым подходящим способом, известным в настоящей области техники. Например, интегрин-опосредованная активация TGF $\beta$  может быть использована в исследовании на клетках, таком как анализ люциферазы "CAGA12", описанном более подробно в настоящем документе. Как показано, такая система анализа может содержать следующие компоненты: i) источник TGF (рекомбинантный, эндогенный или трансфицированный); ii) источник активатора, такой как интегрин (рекомбинантный, эндогенный или трансфицированный) и iii) репортерную систему, которая реагирует на активацию TGF $\beta$ , такую как клетки, экспрессирующие рецепторы TGF $\beta$ , способные реагировать на TGF $\beta$  и транслировать сигнал в читаемый выход (например, активность люциферазы в клетках CAGA12 или других репортерных клеточных линиях). Согласно некоторым вариантам осуществления репортерная клеточная линия содержит репортерный ген (например, ген люциферазы) под контролем TGF $\beta$ -чувствительного промотора (например, промотора PAI-1). Согласно некоторым вариантам осуществления определенные промоторные элементы, которые придают чувствительность, могут быть включены в репортерную систему. Согласно некоторым вариантам осуществления таким промоторным элементом является элемент CAGA12. Репортерные клеточные линии, которые могут быть использованы в анализе, описаны, например, в публикации Abe et al. (1994) *Anal Biochem.* 216(2): 276-84, включенной в настоящий документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам осуществления каждый из вышеуказанных компонентов анализа предоставляется из одного и того же источника (например, из одной и той же клетки). Согласно некоторым вариантам осуществления два из вышеуказанных компонентов анализа предоставляются из одного и того же источника, а третий компонент анализа предоставляется из другого источника. Согласно некоторым вариантам осуществления все три компонента анализа предоставляются из разных источников. Например, согласно некоторым вариантам осуществления интегрин и латентный комплекс TGF $\beta$  (про-TGF $\beta$  и презентующая молекула) предоставляются для анализа из одного и того же источника (например, одной и той же трансфицированной клеточной линии). Согласно некоторым вариантам осуществления интегрин и TGF предоставляются для анализа из отдельных источников (например, двух разных клеточных линий, комбинации очищенного интегрина и трансфицированной клетки). Когда клетки используются в качестве источника одного или нескольких компонентов анализа, такие компоненты анализа могут быть эндогенными для клетки, стабильно экспрессированными в клетке, временно трансфицированными или любой их комбинацией. Результаты неограничивающего иллюстративного варианта осуществления исследования на клетках для измерения активации TGF $\beta$ , демонстрирующего ингибирование либо комплекса GARP-про-TGF $\beta$ 1, либо комплекса LRRC33-про-TGF $\beta$ 1 с использованием антител Ab1 и Ab2, раскрыты в настоящем документе. В этом примере анализа IC50 (мкг/мл) Ab1 для комплекса GARP-TGF $\beta$ 1 составлял 0,445, а IC50 (мкг/мл) Ab1 для комплекса LRRC33-TGF $\beta$ 1 составлял 1,325.

Специалист в настоящей области техники может легко адаптировать такие анализы к различным подходящим конфигурациям. Например, могут быть рассмотрены различные источники TGF $\beta$ . Согласно некоторым вариантам осуществления источником TGF $\beta$  является клетка, которая экспрессирует и депонирует TGF $\beta$  (например, первичная клетка, размноженная клетка, иммортализованная клетка или клеточная линия и т.д.). Согласно некоторым вариантам осуществления источник TGF $\beta$  представляет собой очищенный и/или рекомбинантный TGF $\beta$ , иммобилизованный в системе анализа с использованием подходящих средств. Согласно некоторым вариантам осуществления TGF $\beta$ , иммобилизованный в аналитической системе, представлен в составе внеклеточного матрикса (ECM) на аналитическом планшете с децеллюляризацией или без нее, которая имитирует происходящий из фибробластов TGF $\beta$ . Согласно некоторым вариантам осуществления TGF $\beta$  представлен на клеточной поверхности клетки, используемой в анализе. Кроме того, выбранная презентующая молекула может быть включена в систему анали-

за для обеспечения подходящего комплекса латентного-TGFβ. Специалист в настоящей области техники может легко определить, какая презентующая молекула может присутствовать или экспрессироваться в определенных клетках или типах клеток. С использованием таких систем анализа можно легко измерить относительные изменения активации TGFβ в присутствии или в отсутствие исследуемого средства (такого как антитело), чтобы оценить влияние исследуемого средства на активацию TGFβ *in vitro*. Данные из иллюстративных исследований на клетках представлены в разделе "Примеры" ниже.

Такие исследования на клетках можно модифицировать или адаптировать различными способами в зависимости от изучаемой изоформы TGF, типа латентного комплекса (например, презентующей молекулы) и т.п. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка, про которую известно, что она экспрессирует интегрин, способный активировать TGF, может быть использована в качестве источника интегрин в анализе. Такие клетки включают в себя клетки SW480/β6 (например, клон 1E7). Согласно некоторым вариантам осуществления клетки, экспрессирующие интегрин, могут быть совместно трансфицированы с плазмидой, кодирующей представляющую интерес молекулу (такую как GARP, LRRC33, LTBP (например, LTBP1 или LTBP3) и т.д.), и плазмидой, кодирующей проформу представляющей интерес изоформы TGFβ (такую как про-TGFβ1). После трансфекции клетки инкубируют в течение времени, достаточного для экспрессии трансфицированных генов (например, приблизительно 24 ч), клетки промывают и инкубируют с серийными разведениями исследуемого средства (например, антитела). Затем в систему анализа добавляют репортерную клеточную линию (например, клетки CAGA12) с последующим подходящим временем инкубации для обеспечения передачи сигналов TGFβ. После инкубационного периода (например, приблизительно 18-20 ч) после добавления исследуемого средства сигнал/считывание (например, активность люциферазы) обнаруживают с использованием подходящих средств (например, для экспрессирующих люциферазу репортерных клеточных линий может быть использован реагент Bright-Glo (Promega)). Согласно некоторым вариантам осуществления флуоресценция люциферазы может быть обнаружена с использованием планшет-ридера BioTek (Synergy H1) с настройками автоматического усиления.

Репрезентативные результаты исследований на клетках TGFβ представлены на фиг. 7 в настоящем документе. Данные показывают, что иллюстративные антитела по настоящему изобретению способны избирательно ингибировать активацию TGFβ1 независимо от контекста.

Нуклеиновые кислоты.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, их антигенсвязывающие части и/или композиции по настоящему изобретению могут кодироваться молекулами нуклеиновой кислоты. Такие молекулы нуклеиновой кислоты включают в себя, без ограничения, молекулы ДНК, молекулы РНК, полинуклеотиды, олигонуклеотиды, молекулы мРНК, векторы, плазмиды и т.п. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие может содержать клетки, запрограммированные или созданные для экспрессии молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих соединения и/или композиции по настоящему раскрытию. В некоторых случаях нуклеиновые кислоты по настоящему раскрытию включают в себя кодон-оптимизированные нуклеиновые кислоты. Способы получения кодон-оптимизированных нуклеиновых кислот известны в настоящей области техники и могут включать в себя, без ограничения, способы, описанные в патентах США № 5786464 и 6141448, содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые никоим образом не предназначены для ограничения. Все содержание всех ссылок, патентов и опубликованных патентных заявок, процитированных в настоящей заявке, а также фигуры, включены в настоящий документ посредством ссылки.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие.

### Примеры

Пример 1. Ингибирование TGFβ1.

Суперсемейство TGFβ включает в себя пропептиды, образующие комплекс с активными факторами роста (фиг. 1). Были разработаны стратегии отбора для получения антител, которые стабилизируют комплекс, что приводит к более селективному и сильному ингибированию.

Используя систему экспрессии на основе НЕК293, аффинность NiNTA и гель-фильтрацию выполняли для получения миллиграммовых количеств очищенного белка, который использовали для получения TGFβ1, образующего комплекс с LTBP (комплекс LTBP-TGFβ1), и TGFβ1, образующего комплекс с GARP (комплекс GARP-TGFβ1) (фиг. 3). Разнообразие производимых белков позволило исследовать перекрестную реактивность форм и картирование эпитопов.

Потенциальные антитела исследовали с использованием анализов люминесценции *in vitro*. При скрининге антитела, которые ингибировали высвобождение факторов роста, выключали репортерные клетки, когда сталкивались со стимулом для нормальной активации. Было показано, что Ab1 и Ab2 являются ингибиторами активации комплексов латентных TGFβ1 и перекрестно реактивны по отношению к мышинным.

Кривые начального анализа зависимости ответа от дозы для Ab1 в клетках, экспрессирующих TGFβ1 человека, показали ингибирование активности TGFβ1. Используя более чувствительную репортерную клеточную линию CAGA12, Ab1 продемонстрировал аналогичное ингибирование активности про-TGFβ1 человека. Кроме того, было показано, что ингибирование комплекса GARP блокирует супрессивную активность T-регуляторных клеток (Treg), измеренную по проценту делящихся T-эффекторных клеток (Teff) в T-клетках, выделенных из крови здорового донора (фиг. 9A).

Аналогичные результаты наблюдались для Ab3. Кривые анализа зависимости ответа от дозы Ab3 в звездчатых клетках печени человека и фибробластах кожи человека показали ингибирование активности TGFβ1 (фиг. 7F), и было также показано, что Ab3 ингибирует супрессивную активность Treg (фиг. 9B).

Аффинность ингибиторов GARP-про-TGFβ1 измеряли с помощью анализа Octet на клетках GARP-про-TGFβ1 человека, тогда как активность измеряли с помощью репортерных клеток CAGA12, исследуя ингибирование GARP-про-TGFβ1 человека. Протокол, используемый для измерения аффинности антител Ab1 и Ab2 к представленным в настоящем документе комплексам, приведен в табл. 6. Результаты показаны в табл. 7.

Таблица 6

## Протокол для проведения анализа связывания Octet

<b>Материалы:</b>
- 96-луночные черные полипропиленовые планшеты - Покрытые стрептавидином наконечники для Octet - 10-кратный кинетический буфер (разбавленный 1:10 в PBS)
1. Замочить необходимое количество стрептавидиновых наконечников в 1-кратном кинетическом буфере; поместить в прибор для уравнивания
2. Загрузить планшеты для образцов: - 200 мкл буфера или разведения антител в каждую лунку a. Колонка 1 - исходный уровень (буфер) b. Колонка 2 - биотинилированный белок (например, sGARP-проTGFβ1 или LTBP1-проTGFβ1); разбавленный до 5 мкг/мл c. Колонка 3 - исходный уровень 2 (буфер) d. Колонка 4 - ассоциация антител для Ab1 e. Колонка 5 - ассоциация антител для Ab2 f. Колонка 6 - диссоциация Ab1 (буфер) g. Колонка 7 - диссоциация Ab2 (буфер)
3. Сделать разведения в 96-луночном планшете: a. Развести оба антитела до 50 мкг/мл в 300 мкл 1-кратного буфера в ряду A. b. Добавить 200 мкл буфера к остальной части каждой колонки c. Перенести 100 мкл вниз по колонке, чтобы сделать 3-кратные разведения
4. Поместить планшет для образцов в прибор рядом с планшетом для наконечников
5. Настроить программное обеспечение a. Указать буфер, загрузку, образец (один анализ на исследуемое антитело) b. Указать стадии протокола (исходный уровень, загрузка, ассоциация, диссоциация) для заданного количества времени: • Исходный уровень: 60 секунд • Загрузка: 300 секунд • Исходный уровень 2: 60 секунд • Ассоциация: 300 секунд • Диссоциация: 600 секунд
6. Анализ данных a. Вычесть исходный уровень из эталонной лунки b. Установить нормализацию на последние пять секунд исходного уровня c. Выровнять диссоциацию
d. Анализ на ассоциацию и диссоциацию (модель связывания 1:1, подгонка кривых) e. Определить лучшие значения R <sup>2</sup> ; включить концентрации с лучшими значениями R <sup>2</sup> f. Выбрать глобальную подгонку g. Установить цвета образцов по типу сенсора h. Проанализировать i. Сохранить таблицу и экспортировать

Таблица 7

## Аффинность и активность ингибиторов GARP-про-TGFβ1

Клон	Аффинность для GARP-проTGFβ1 (нМ ± SEM)	Ингибирование (IC50) GARP-проTGFβ1 (нМ; 95% CI)	Максимальный эффект (% ингибирования)
Ab1	0,046 ± 0,043	3,4 (2,1-5,4)	75%
Ab2	0,561 ± 0,014	3,9 (1,5-10,3)	50%

Затем клоны подвергали скринингу на селективность связывания (табл. 8) и перекрестную реактивность форм (табл. 9). Ab1 и Ab2 не связывались с TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 или TGF $\beta$ 3, но связывались с комплексами про-TGF $\beta$ 1 и проявляли перекрестную реактивность форм.

Таблица 8

Клон	GARP-проTGF $\beta$ 1	LTBP1-проTGF $\beta$ 1	LTBP3-проTGF $\beta$ 1
Ab1	+++	+++	+++
Ab2	+++	+++	+++

Таблица 9

Клон	huGARP-проTGF $\beta$ 1	muGARP-проTGF $\beta$ 1	cyGARP-проTGF $\beta$ 1
Ab1	+++	++	+++
Ab2	+++	+++	+++

+++ KD < 1 нМ,  
 ++ KD 1 - 10 нМ,  
 + KD 10-100 нМ.  
 - Нет связывания.

Специфичность связывания для Ab3 дополнительно исследовали с помощью анализа связывания Octet. Как показано на фиг. 4А, Ab3 специфично связывается с латентным TGF $\beta$ 1, но не с латентным TGF $\beta$ 2 или латентным TGF $\beta$ 3, тогда как антитела к пан-TGF-бета не специфичны к изоформе (фиг. 5). Эти данные демонстрируют, что Ab3 связывается с TGF $\beta$  специфичным к изоформе образом.

Пример 2. Ab1, Ab2 и Ab3 специфично связываются с комплексами про-TGF $\beta$ 1 от нескольких видов.

Чтобы определить, способны ли Ab1, Ab2 и Ab3 специфично связываться с комплексами про-TGF $\beta$ 1 от нескольких видов, анализы связывания Octet проводили, как описано в табл. 6. Как показано в табл. 10 (ниже), все три антитела (т.е. Ab1, Ab2 и Ab3) специфично связывались с человеческими и мышиными комплексами LTBP1-про-TGF $\beta$ 1, человеческими комплексами LTBP3-про-TGF $\beta$ 1 и человеческими комплексами GARP-про-TGF $\beta$ 1. Однако только Ab2 и Ab3 специфично связывались с комплексами LTBP1-про-TGF $\beta$ 1 крысы.

Таблица 10

	Ab1 (K <sub>D</sub> )	Ab2 (K <sub>D</sub> )	Ab3 (K <sub>D</sub> )
LTBP1-проTGF $\beta$ 1 человека	16 ± 1,3	5,8 ± 0,6	1,1 ± 0,07
LTBP3-проTGF $\beta$ 1 человека	85 ± 5,0	122 ± 3,9	0,12 ± 0,04
LTBP1-проTGF $\beta$ 1 мыши	203 ± 13	61 ± 4,0	0,68 ± 0,06
LTBP1-проTGF $\beta$ 1 крысы	Связывание не обнаружено	38 ± 6,8	0,93 ± 0,03
GARP-проTGF $\beta$ 1 человека	293 ± 22	58 ± 6,2	4,9 ± 0,11

Пример 3. Ab2 и Ab3 связываются с LRRC33-про-TGF $\beta$ 1.

Чтобы определить, связываются ли Ab1, Ab2 и Ab3 с про-TGF $\beta$ 1, который находится в комплексе с LRRC33, проводили анализы связывания Octet. Как показано на фиг. 12С, Ab1, Ab2 и Ab3 способны связываться с белковым комплексом LRRC33-про-TGF $\beta$ 1. Однако Ab1 демонстрирует медленную скорость связывания белкового комплекса LRRC33-про-TGF $\beta$ 1. Связывание Ab1, Ab2 и Ab3 с белковым комплексом LRRC33-про-TGF $\beta$ 1 дополнительно подтверждали с помощью ИФА.

Пример 4. Ab1, Ab2 и Ab3 ингибируют активность как GARP-про-TGF $\beta$ 1, так и LRRC33-про-TGF $\beta$ 1.

Чтобы определить, ингибируют ли Ab1, Ab2 и Ab3 активность GARP-про-TGF- $\beta$ 1 и/или LRRC33-про-TGF- $\beta$ 1, проводили исследование на клетках *in vitro*. В этой аналитической системе сконструированная клеточная линия рака толстой кишки человека (клетки SW480/ $\beta$ 6), стабильно трансфицированная интегрином  $\beta$ 6, совместно трансфицировали с конструкцией для экспрессии про-TGF- $\beta$ 1 и конструкцией для экспрессии презентующей молекулы (т.е. GARP или LRRC33). Для экспрессии презентующих молекул использовали конструкции, кодирующие химерный LRRC33-GARP (SEQ ID NO: 101) или GARP. Трансфицированные клетки инкубировали для обеспечения достаточной экспрессии и осаждения

компонентов (интегринов и про-TGFβ1 в комплексе с соответствующей презентующей молекулой). Активацию TGFβ1 в присутствии или в отсутствие Ab1 или Ab2, или Ab3 анализировали с использованием репортерных клеток (клеток CAGA12), экспрессирующих рецепторы TGFβ, связанных с их последующим путем сигнальной трансдукции, для измерения ингибирующей активности антитела. Как показано на фиг. 7А и 7В, Ab1, Ab2 и Ab3 ингибировали как GARP-про-TGF-β1, так и LRRC33-про-TGF-β1.

Дополнительно проводили исследование на клетках для выявления ингибирования либо комплекса GARP-про-TGFβ1, либо комплекса LRRC33-про-TGFβ1 с использованием антител Ab1 и Ab2. Ab1 и Ab2 ингибировали как GARP-про-TGF-β1, так и LRRC33-про-TGF-β1. В этом анализе IC50 (мкг/мл) Ab1 для комплекса GARP-TGFβ1 составлял 0,445, а IC50 (мкг/мл) Ab1 для комплекса LRRC33-TGFβ1 составлял 1,325.

Пример 5. Анализы для обнаружения специфичной к LTBP-TGFβ1 активации.

Согласно некоторым вариантам осуществления представленные в настоящем документе способы и композиции относятся к способу обнаружения комплекса LTBP-TGFβ1, например, комплекса LTBP1-или LTBP3-TGFβ1, в образце.

А. Активация латентного TGFβ1, депонированного в ECM.

В этом анализе презентующие молекулы совместно трансфицировали с про-TGFβ1 в клетках, экспрессирующих интегрин. Временно трансфицированные клетки высевают в чашки для анализа в присутствии ингибиторов. Латентный комплекс LTBP-про-TGFβ1 встраивают в ECM. Репортерные клетки TGFβ затем добавляют в систему; свободный фактор роста (высвобождаемого интегрином) дает сигнал и обнаруживается с помощью анализа на люциферазу.

Следующий протокол является одним примером для измерения активации внеклеточного матрикса (презентируется LTBP) клетками интегрин. Материалы включают в себя: клетки MvLu1-CAGA12 (клон 4A4); клетки SW480/β6 (клон 1E7) (субъединица αV эндогенно экспрессируется на высоких уровнях; субъединица β6 стабильно избыточно экспрессируется); клеточная линия LN229 (высокий уровень эндогенного интегрин V8); обработанный Costar с белыми стенками TC 96-луночный планшет для анализа №3903; 96-луночный планшет для анализа Greiner Bio-One High Binding №655094; человеческий фибронектин (Corning #354008); многоканальная пипетка P200; пипетки P20, P200 и P1000 со стерильными фильтрующими наконечниками для каждой; стерильные микроцентрифужные пробирки и штатив; стерильные резервуары с реагентами; 0,4% трипановый синий; стерильные пипетки объемом 2, 5, 10 и 25 мл; обработанные культурами тканей 100 мм или 150 мм планшеты; 70% этанол; Opti-MEM с пониженным содержанием сыворотки (Life Tech №31985-070); липофектамин 3000 (Life Tech №L3000015); реагент для анализа люциферазы Bright-Glo (Promega №E2620); триспин в концентрации 0,25% + ЭДТА в концентрации 0,53 мМ; плазмида экспрессии про-TGFβ1 человека (SR005); экспрессирующая плазмида LTBP1S человека (SR044); экспрессирующая плазмида LTBP3 человека (SR117); экспрессирующая плазмида LRRC32 (GARP) человека (SR116) и экспрессирующая плазмида LRRC33 человека (SR386). Используемое оборудование включает в себя: планшет-ридер BioTek Synergy H1; воронку TC; настольную центрифугу; CO<sub>2</sub>-инкубатор с температурой 37°C и 5% CO<sub>2</sub>; водяная/шариковая ванна с температурой 37°C; шейкер с платформой; микроскоп и гемоцитометр/анализатор.

"Клетки CAGA12 4A4" представляют собой производные клеток MvLu1 (эпителиальные клетки легких норки), стабильно трансфицированные синтетическим промотором CAGA12, управляющим экспрессией гена люциферазы. "DMEM-0,1% BSA" представляет собой среду для анализа; основная среда представляет собой DMEM (Gibco № в каталоге 11995-065), среда также содержит BSA, разбавленный до 0,1% мас./об., пенициллин/стрептомицин и 4 мМ глутамин. "D10" относится к DMEM 10% FBS, P/S, 4 мМ глутамина, 1% NEAA, 1-кратный GlutaMAX (Gibco № в каталоге 35050061). "Среда SW480/β6" относится к D10 + 1000 мкг/мл G-418. "Среда CAGA12 (4A4)" относится к D10 + 0,75 мкг/мл пуромицина.

В день 0 клетки высевают для трансфекции. Клетки SW480/β6 (клон 1E7) отделяют трипсином и осаждают (вращение 5 мин при 200×g). Осадок клеток повторно суспендируют в среде D10 и подсчитывают количество жизнеспособных клеток на мл. Клетки высевают в количестве 5,0e6 клеток/12 мл/100 мм чашки TC. Для клеток CAGA12 клетки пассируют с плотностью 1,0 млн. на колбу T75, чтобы использовать для анализа на 3-й день. Культуры инкубируют при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

В день 1 трансфицируют экспрессирующие интегрин клетки. Соблюдают протокол производителя для трансфекции реагентом липофектамино 3000. Вкратце, в OptiMEM I разводят следующее для 125 мкл на лунку: 7,5 мкг ДНК (презентирующая молекула) + 7,5 мкг ДНК (про-TGFβ1), 30 мкл P3000 и до 125 мкл с OptiMEM I. Лунку смешивают путем пипетирования ДНК вместе, затем добавляют OptiMEM. Добавляют P3000 и все хорошо перемешивают пипеткой. Готовят мастер-смесь липофектамин 3000 для добавления в смеси ДНК: для анализа LTBP1: 15 мкл липофектамина 3000, до 125 мкл в OptiMEM I на лунку; для анализа LTBP3: 45 мкл липофектамина 3000, до 125 мкл в OptiMEM I на лунку. Разбавленный липофектамин 3000 добавляют к ДНК, хорошо перемешивают пипеткой и инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин. После инкубации раствор перемешивают несколько раз

пипеткой, а затем по каплям добавляют 250 мкл ДНК: липофектамин 3000 (2×125 мкл) на чашку. Каждую чашку осторожно взбалтывают для перемешивания, и чашку возвращают в инкубатор для тканевых культур на ~24 ч.

Эквивалентные количества каждой плазмиды, как правило, являются оптимальными для совместной трансфекции. Однако совместная трансфекция может быть оптимизирована путем изменения соотношения плазмидных ДНК для презентующей молекулы и про-TGFβ 1.

В дни 1-2 планшеты для анализа покрывали человеческим фибронектином. В частности, лиофилизированный фибронектин разбавляют до 1 мг/мл в ультрачистой дистиллированной воде (стерильной). 1 мг/мл исходного раствора разбавляют до 19,2 мкг/мл в PBS (стерильном). 50 мкл/лунку добавляют в планшет для анализа (высокая степень связывания) и инкубируют O/N в инкубаторе для тканевых культур (температура 37°C и 5% CO<sub>2</sub>). Конечная концентрация составляет 3,0 мкг/см<sup>2</sup>.

В день 2 трансфицированные клетки высевали для анализа и добавления ингибитора. Сначала фибронектиновое покрытие промывают, добавляя 200 мкл/лунку PBS к раствору фибронектина, уже находящемуся в планшете для анализа. Промывку удаляют вручную с помощью многоканальной пипетки. Промывку повторяют два раза. Планшет дают высохнуть при комнатной температуре с закрытой крышкой перед добавлением клеток. Затем клетки высевают путем отделения с помощью трипсина и осаждают (вращение 5 мин при 200×g.). Осадок ресуспендируют в среде для анализа, и количество жизнеспособных клеток подсчитывают на мл. Для анализа LTBP1 клетки разводят до 0.10e6 клеток/мл и высевают 50 мкл на лунку (5000 клеток на лунку). Для анализа LTBP3 клетки разводят до 0,05e6 клеток/мл и высевают 50 мкл на лунку (2500 клеток на лунку). Для приготовления функциональных разведений антител антитела предварительно разводят до постоянной рабочей концентрации в наполнителе. Исходные антитела серийно разводят в наполнителе (PBS является оптимальным, следует избегать натрий цитратного буфера). Каждую точку серийного разведения разводят в среде для анализа для 4-кратной конечной концентрации антитела. Добавляют 25 мкл на лунку 4-кратного антитела и культуры инкубируют при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение ~24 ч.

В день 3 добавляют репортерные клетки TGF. Клетки CAGA12 (клон 4A4) для анализа отделяют трипсином и осаждают (вращение 5 мин при 200×g). Осадок ресуспендируют в среде для анализа и подсчитывают количество жизнеспособных клеток на мл. Клетки разбавляют до 0,4e6 клеток/мл и высевают 50 мкл на лунку (20000 клеток на лунку). Клетки возвращаются в инкубатор.

В день 4 анализ считывают (через 16-20 ч после добавления антител и/или репортерных клеток). Реагенту и исследуемому планшету Bright-Glo дают нагреться до комнатной температуры перед считыванием. Настройки считывания в BioTek Synergy H1 устанавливают с использованием протокола TMLC\_std - этот способ имеет настройку автоматического усиления. Лунки положительного контроля отбирают для автомасштабирования (высокий уровень). На каждую лунку добавляется 100 мкл реагента Bright-Glo. Инкубируют в течение 2 мин при встряхивании при комнатной температуре; защищая планшет от света. Планшет считывают на BioTek Synergy H1.

Данные, полученные в результате этого анализа, отражают активность связывания LTBP1-TGFβ1 и/или LTBP3-TGFβ1 в супернатантах клеток.

В. Активация латентного TGFβ1, представленного на клеточной поверхности.

Для выявления активации латентного TGFβ1, представленного на клеточной поверхности, презентующие молекулы совместно трансфицируют с про-TGFβ1 в экспрессирующих интегрин клетках. Латентный TGFβ1 экспрессируется на клеточной поверхности с помощью GARP или LRRC33. Репортерные клетки и ингибиторы TGFβ затем добавляют в систему; свободный фактор роста (высвобождаемый интегрином) дает сигнал и обнаруживается с помощью анализа на люциферазу. Этот анализ или протокол "прямой трансфекции" является оптимальным для активации TGFβ1 (презентатор GARP или LRRC33) на клеточной поверхности интегрином клеток.

Используемые материалы включали в себя: клетки MvLu1-CAGA12 (клон 4A4); клетки SW480/β6 (клон 1E7) (субъединица αV эндогенно экспрессируется на высоких уровнях; субъединица β6 стабильно избыточно экспрессируется); клеточная линия LN229 (высокий уровень эндогенного интегрин V8); обработанный Costar с белыми стенками TC 96-луночный планшет для анализа №3903; 96-луночный планшет для анализа Greiner Bio-One High Binding № 655094; человеческий фибронектин (Coating №354008); многоканальная пипетка P200; пипетки P20, P200 и P1000 со стерильными фильтрующими наконечниками для каждой; стерильные микроцентрифужные пробирки и штатив; стерильные резервуары с реагентами; 0,4% трипановый синий; стерильные пипетки объемом 2 мл, 5 мл, 10 мл и 25 мл; обработанные культурами тканей 100 мм или 150 мм планшеты; 70% этанол; Opti-MEM с пониженным содержанием сыворотки (Life Tech №31985-070); липофектамин 3000 (Life Tech №L3000015); реагент для анализа люциферазы Bright-Glo (Promega №E2620); трипсин в концентрации 0,25% + ЭДТА в концентрации 0,53 мМ; экспрессирующая плазида про-TGFβ1 человека (SR005); экспрессирующая плазида LTBP1S человека (SR044); экспрессирующая плазида LTBP3 человека (SR117); экспрессирующая плазида LRRC32 (GARP) человека (SR116) и экспрессирующая плазида LRRC33 человека (SR386).

Используемое оборудование включает в себя: планшет-ридер BioTek Synergy H1; воронку TC; на-

стольную центрифугу; CO<sub>2</sub>-инкубатор с температурой 37°C и 5% CO<sub>2</sub>; водяная/шариковая ванна с температурой 37°C; шейкер с платформой; микроскоп и гемоцитометр/анализатор.

Термин "клетки CAGA12 4A4" относится к производному клеток MvLu1 (эпителиальные клетки легких норки), стабильно трансфицированному синтетическим промотором CAGA12, управляющим экспрессией гена люциферазы. "DMEM-0,1% BSA" относится к среде для анализа; основная среда представляет собой DMEM (Gibco № в каталоге 11995-065), среда также содержит BSA, разбавленный до 0,1% мас./об., пенициллин/стрептомицин и 4 мМ глютамин. "D10" относится к DMEM 10% FBS, P/S, 4 мМ глютамина, 1% NEAA, 1-кратный GlutaMAX (Gibco в каталоге 35050061). "Среда SW480/β6" относится к D10 + 1000 мкг/мл G-418. "Среда CAGA12 (4A4)" относится к D10 + 0,75 мкг/мл пурамицина.

В день 0 экспрессирующие интегрин клетки высевают для трансфекции. Клетки отделяют трипсином и осаждают (вращение 5 мин при 200×g). Осадок клеток повторно суспендируют в среде D10 и подсчитывают количество жизнеспособных клеток на мл. Клетки разводят до количества 0,1e5 клеток/мл и высевают в количестве 100 мкл на лунку (10000 клеток на лунку) в планшет для анализа. Для клеток CAGA12 клетки пассируют с плотностью 1,5 млн на колбу T75, чтобы использовать для анализа в день 2. Культуры инкубируют при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

В день 1 клетки трансфицируют. Соблюдается протокол производителя для трансфекции реагентом липофектамин 3000. Вкратце, в OptiMEM I разводят следующее по 5 мкл на лунку: 0,1 мкг ДНК (презентирующая молекула) + 0,1 мкг ДНК (про-TGFβ1), 0,4 мкл P3000 и до 5 мкл с OptiMEM I. Лунку смешивают путем пипетирования ДНК вместе. Затем добавляют OptiMEM. Добавляют P3000 и все хорошо перемешивают пипеткой. Мастер-раствор делают с липофектамином 3000, для добавления в смеси ДНК: 0,2 мкл липофектамина 3000, до 5 мкл в OptiMEM I, на лунку. Разбавленный липофектамин 3000 добавляют к ДНК, хорошо перемешивают пипеткой и инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин. После инкубации раствор смешивают несколько раз пипеткой, а затем добавляют 10 мкл на лунку ДНК:липофектамин 3000 (2×5 мкл). Планшет с клетками возвращают в инкубатор для тканевых культур на ~24 ч.

В день 2 добавляют антитело и репортерные клетки TGF. Чтобы приготовить функциональные разведения антител, исходное антитело в наполнителе (PBS является оптимальным) серийно разводят. Затем каждую точку разводят в среде для анализа для 2-кратной конечной концентрации антитела. После получения антител клеточный планшет дважды промывают с помощью аналитической среды, путем аспирации (вакуум-аспиратор) с последующим добавлением 100 мкл на лунку среды для анализа. После второй промывки среду для анализа заменяют на 50 мкл на лунку 2-кратного антитела. Планшет с клетками возвращают в инкубатор на ~15-20 мин.

Чтобы подготовить клетки CAGA12 (клон 4A4) для анализа, клетки отделяют трипсином и осаждают (вращение 5 мин при 200×g). Осадок ресуспендируют в среде для анализа и подсчитывают количество жизнеспособных клеток на мл. Клетки разбавляют до 0,3e6 клеток/мл и высевают 50 мкл на лунку (15000 клеток на лунку). Клетки возвращаются в инкубатор.

В день 3 анализ считывают через 16-20 ч после добавления антитела и/или репортерной клетки. Реагенту и тест-планшету Bright-Glo дают нагреться до комнатной температуры перед считыванием. Настройки считывания в BioTek Synergy H1 настроены на использование протокола TMLCstd - этот способ имеет настройку автоматического усиления. Лунки положительного контроля устанавливают для автоматического масштабирования (высокий уровень). На каждую лунку добавляют 100 мкл реагента Bright-Glo. Инкубируют в течение 2 мин при встряхивании при комнатной температуре; защищая планшет от света. Планшет считывают на BioTek Synergy H1.

Данные, полученные из этого анализа, отражают активность TGFβ1 в клеточных супернатантах. Единицы необработанных данных представляют собой относительные световые единицы (RLU). Образцы с высокими значениями RLU содержат высокие количества свободного TGFβ1, образцы с низкими значениями RLU содержат низкие уровни TGFβ1.

Пример 6. Ab1 и Ab2 ингибируют эндогенный TGFβ1 в фибробластах человека и мыши.

Чтобы определить, способны ли Ab1 и Ab2 ингибировать эндогенный TGF-β1, секретируемый первичными культивируемыми фибробластами различного происхождения, проводили количественный анализ *in vitro*, в котором определяли активность секретируемого TGF-β1 путем измерения уровней люциферазы, производимой эпителиальными клетками легких норки, которые стабильно трансфицировали с нуклеиновой кислотой, содержащей репортерный ген люциферазы, слитой с синтетическим промотором CAGA12, и совместно культивировали с фибробластами, обработанными либо Ab1, либо Ab2. Как показано на фиг. 7G и 7H, Ab1, и Ab2 ингибировали эндогенный TGF-β1, секретируемый нормальными человеческими дермальными фибробластами, мышинными фибробластами легкого C57BL.6J и мышечными фибробластами DBA2/J. Различия в максимальном ингибировании, наблюдаемом с каждым антителом, были специфичны для клеточной линии.

Пример 7. Роль жесткости матрикса и влияние специфичных к TGFβ1, независимых от контекста антител на индуцированную интегрином активацию TGFβ1 *in vitro*.

Чтобы исследовать, могут ли субстраты с различными степенями жесткости модулировать актива-

цию TGF $\beta$ 1, основанные на кремнии субстраты с контролируемой жесткостью (5 кПа, 15 кПа и 100 кПа) использовали для измерения зависимой от интегрин активации TGF $\beta$ 1 в первичных фибробластах, нанесенных на них. Вкратце, клетки SW480 совместно трансфицировали с про-TGF $\beta$ 1 и LTBP1 для обеспечения внеклеточной презентации латентного комплекса TGF $\beta$ 1. Клетки со сверхэкспрессией интегрин  $\alpha$ v $\beta$ 6 добавляли в систему анализа для запуска активации TGF $\beta$ 1. Активацию TGF $\beta$ 1 определяли путем измерения активации чувствительного к TGF $\beta$  репортерного гена. В этом случае интегрин  $\alpha$ v $\beta$ 6 вызывал приблизительно двукратное увеличение опосредованной LTBP1 активации TGF $\beta$ 1 в клетках, нанесенных на кремниевые субстраты с высокой жесткостью (100 кПа), по сравнению с клетками, культивируемыми на кремниевых субстратах с более низкой (5 или 15 кПа) жесткостью при прочих равных условиях. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что специфичные к изоформе, перmissive по отношению к контексту ингибиторы активации TGF $\beta$ 1, такие как описанные в настоящем документе, могут супрессировать этот эффект, снижая активацию TGF $\beta$ 1 приблизительно до половины уровня по сравнению с отсутствием контроля антител при всей исследуемой жесткости.

Пример 8. Влияние специфичных к TGF $\beta$ 1, независимых от контекста антител на индуцированную протеазой активацию TGF $\beta$ 1 *in vitro*.

Для исследования независимой от интегрин, зависимой от протеазы активации TGF $\beta$ 1 *in vitro* очищенный рекомбинантный комплекс LTBP3-про-TGF $\beta$ 1 инкубировали с калликреином (KLK), и активацию TGF $\beta$ 1 измеряли с использованием репортерной клеточной системы, как описано. TGF $\beta$ 1 высвобождался из латентного комплекса после инкубации с KLK, но не с одним наполнителем, что указывает на то, что ECM-ассоциированная активность TGF $\beta$ 1 может запускаться зависимым от протеазы образом.

Для дополнительного исследования способности специфичного к изоформе, независимого от контекста ингибирующего антитела ингибировать альтернативный способ (например, независимый от интегрин) активации TGF $\beta$ 1, проводили анализ *in vitro* для оценки активации калликреином TGF $\beta$ 1.

Вкратце, репортерные клетки CAGA высевали за 24 ч до начала анализа. про-TGF $\beta$ -C4S титровали на клетки CAGA. Протеазу KLK плазмы добавляли в фиксированной концентрации 1 микрограмм на мл или 500 нанограмм на мл. Смесь для анализа инкубировали в течение приблизительно 18 ч. Активацию TGF $\beta$  измеряли анализом люциферазы. Данные показаны на фиг. 8. В присутствии KLK активируется про-TGF $\beta$ 1 (положительный контроль). Эта активация TGF $\beta$  эффективно ингибировалась добавлением Ab3, что указывает на то, что в дополнение к зависимой от интегрин активации TGF $\beta$ 1 специфичное к изоформе, независимое от контекста ингибирующее антитело также может блокировать зависимую от KLK активацию TGF $\beta$ 1 *in vitro*. Сходным образом ингибирование активированного посредством KLK TGF $\beta$ 1 также наблюдали с добавлением Ab1 (данные не показаны).

Пример 9. Экспрессия LRRC33 в поляризованных и активированных макрофагах.

Ранее было описано, что передача сигналов TGF $\beta$  участвует в созревании, дифференцировке и возможных фенотипах макрофагов. Предполагается, что происходящие из моноцитов макрофаги экспрессируют LRRC33. Дополнительные исследования поляризованных макрофагов показали, что не все поляризованные макрофаги экспрессируют LRRC33. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что так называемые классические макрофаги типа M1 демонстрируют низкую экспрессию LRRC33, в то время как макрофаги M2 демонстрируют повышенную экспрессию LRRC33. Неожиданно среди подтипов макрофагов M2 авторы настоящего изобретения наблюдали экспрессию LRRC33 только в M2c и M2d, TAM-подобных макрофагах. Первый представляет собой так называемые "профиброзные" макрофаги, а второй представляет собой "TAM-подобный" или имитирующий опухолеассоциированный фенотип. Эти результаты показывают, что экспрессия LRRC33 ограничена селективным подмножеством поляризованных макрофагов.

Данные свидетельствуют о том, что опухолевые клетки и/или окружающие опухолевые стромальные клетки секретируют ряд цитокинов, факторов роста и хемокинов, которые могут влиять на фенотипы (например, активацию, дифференцировку) различных клеток в TME. Например, колониестимулирующий фактор макрофагов (M-CSF, также называемый CSF-1) является известным опухолевым фактором, который может регулировать активацию и фенотип TAM.

Были проведены анализы сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) для изучения влияния воздействия M-CSF на экспрессию LRRC33 в макрофагах. Вкратце, человеческие PBMC собирали у здоровых доноров. Первичные клетки культивировали в течение одной недели в среде, содержащей 10% человеческой сыворотки, плюс GM-CSF или M-CSF. Для индукции различных фенотипов макрофагов M2 клетки культивировали в течение дополнительных 2-3 дней в присутствии IL-10 и TGF $\beta$  для подтипа M2c и IL-6 для подтипа M2d. Антитела против маркеров клеточной поверхности, как показано на фигуре использовали в анализах FACS. Иммуномагнитная селекция CD14+ указывает на моноциты.

Удивительно, но результаты показали, что активация LRRC33 клеточной поверхности на макрофагах была значительно увеличена при воздействии M-CSF (также известного как CSF-1). На фиг. 10A показано, что макрофаги, обработанные M-CSF, однородно соответствуют макрофагам с M2-поляризацией. Кроме того, воздействие M-CSF заставляет макрофаги равномерно экспрессировать LRRC33 на поверх-

ности клетки (смотрите фиг. 10B). Как представлено на фиг. 10C, наблюдалась устойчивая экспрессия LRRC33 на макрофагах, активированных M-CSF. Эти результаты предполагают, что факторы, происходящие из опухоли, такие как M-CSF, могут индуцировать активацию локальных макрофагов для поддержки роста опухоли.

Пример 10. Влияние Ab3 на активность регуляторных Т-клеток (Treg) *in vivo*.

Было показано, что GARP экспрессируется на регуляторных Т-клетках. Влияние Ab3 на регуляторную активность Т-клеток *in vivo* оценивали с использованием модели колита с переносом Т-клеток (Powrie et al., 1993 *International Immunology*, 5(11): 1464-1474; Powrie et al., 1994 *Immunity*, 1: 553-562; Powrie et al., 1996 *J. Exp. Med.*, 186: 2669-2674). Известно, что перенос Т-клеток CD45Rb<sup>hi</sup> мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) вызывает колит, а совместный перенос CD45Rb<sup>lo</sup> CD25<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток (Treg) ингибирует развитие колита и оказывает защитное действие на мышей. Как показано на фиг. 11, мыши, получавшие 30 мг/кг Ab3, устраняли защитный эффект, демонстрируемый совместным переносом CD45Rb<sup>lo</sup> CD25<sup>+</sup> Treg. В частности, мыши, получавшие 30 мг/кг Ab3, продемонстрировали значительное увеличение показателя воспаления проксимального отдела толстой кишки и отношения массы к длине толстой кишки, а также значительное снижение прироста массы тела по сравнению с контролем IgG. Эти данные демонстрируют, что Ab3 способно супрессировать регуляторную активность Т-клеток *in vivo*.

Пример 11. Влияние Ab1 и Ab2 отдельно или в комбинации с антителом к PD-1 на прогрессирующие опухоли на мышинной сингенной модели карциномы толстой кишки MC38.

Для оценки влияния Ab1 и Ab2, отдельно или в сочетании с антителом к PD-1, на уменьшение прогрессирования опухоли карциномы толстой кишки, использовали мышиную сингенную модель C38BL/6 карциномы толстой кишки мыши MC38.

Культура опухолевых клеток.

Клетки карциномы толстой кишки мыши MC38 выращивали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM), содержащей эмбриональную бычью сыворотку в концентрации 10%, 100 единиц/мл натрия пенициллина G, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата, 25 мкг/мл гентамицина и глутамин в концентрации 2 mM. Культуры клеток поддерживали в колбах для тканевых культур во влажном инкубаторе при температуре 37°C, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха.

Имплантация *in vivo* и рост опухоли.

Используемые для имплантации клетки MC38 собирали во время фазы логарифмического роста и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (PBS). В день имплантации опухоли каждой исследуемой мышью подкожно инъецировали в правый бок  $5 \times 10^5$  клеток (0,1 мл клеточной суспензии), и контролировали рост опухоли, когда средний размер приближался к целевому диапазону от 80 до 120 мм<sup>3</sup>. Спустя одиннадцать дней, обозначенные как день 1 исследования, мышей сортировали в соответствии с рассчитанным размером опухоли на группы, каждая из которых состояла из двенадцати животных с индивидуальными объемами опухолей в диапазоне от 63 до 196 мм<sup>3</sup> и средними по группам объемами опухолей от 95 до 98 мм<sup>3</sup>. Опухоли измеряли в двух измерениях с помощью штангенциркуля, а объем рассчитывали по формуле:

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

где w = ширина и l = длина в мм опухоли. Масса опухоли может быть оценена с допущением, что 1 мг эквивалентен 1 мм<sup>3</sup> объема опухоли.

Лечение.

Вкратце, восьминедельным самкам мышей C57BL/6 (n=12) с подкожными опухолями MC38 (63-172 мм<sup>3</sup>) в день 1 вводили внутривенно (i.p.) два раза в неделю в течение четырех недель либо Ab1, Ab2, мышиное контрольное антитело IgG1 (каждое в дозе 30 мг/кг в дозируемом объеме 10 мл/кг). Когда опухоли достигали 150 мм<sup>3</sup> (день 6) в контрольных группах, мышам вводили либо крысиное антитело к мышиному PD-1 (RMP1-14), либо крысиное контрольное антитело IgG2A, т.е. два раза в неделю в течение двух недель (каждое антитело в дозе 5 мг/кг в дозируемом объеме 10 мл/кг).

Группа 1 служила контролем роста опухоли и получала мышиное контрольное антитело изотипа IgG1 в комбинации с контрольным крысиным антителом IgG2a. Группа 2 получала Ab1 в сочетании с контрольным крысиным антителом IgG2a. Группа 3 получала Ab2 в сочетании с контрольным крысиным антителом IgG2a. Группа 3 получала мышиное контрольное антитело IgG1 в сочетании с антителом к PD-1. Группа 4 получала Ab1 в сочетании с антителом к PD-1. Группа 5 получила Ab2 в сочетании с антителом к PD-1. Группу 6 (n=16) не лечили и использовали в качестве контрольной группы.

Анализ конечной точки и задержки роста опухоли (TGD).

Опухоли измеряли с использованием штангенциркуля два раза в неделю, и каждое животное подвергали эвтаназии, когда его опухоль достигала объема конечной точки 1000 мм<sup>3</sup> или в конце исследования (день 60), в зависимости от того, что происходило раньше. Мышей, которые вышли из исследования по конечной точке объема опухоли, зарегистрированы как умерщвленные во время прогрессирования опухоли (TP) с датой эвтаназии. Время до конечной точки (TTE) для анализа рассчитывали для каждой мыши в соответствии со способами, описанными в предварительной заявке США № 62/558311, поданной 13 сентября 2017 г.

MTV и критерии регрессионных ответов.

Эффективность лечения можно определить по объемам опухолей у животных, оставшихся в исследовании в последний день. MTV (n) определяли как средний объем опухоли в последний день исследования из числа оставшихся животных (n), у которых опухоли не достигли конечного объема.

Эффективность лечения также можно определить по частоте и величине регрессионных ответов, наблюдаемых в ходе исследования. Лечение может вызвать частичную регрессию (PR) или полную регрессию (CR) опухоли у животного. В ответе PR объем опухоли составлял 50% или менее от ее объема в день 1 для трех последовательных измерений в течение исследования и равнялся или превышал 13,5 мм<sup>3</sup> для одного или нескольких из этих трех измерений. В ответе CR объем опухоли составлял менее чем 13,5 мм<sup>3</sup> для трех последовательных измерений в течение исследования. Животное с ответом CR в конце исследования дополнительно классифицировали как выжившее без опухолей (TFS). Животных контролировали по регрессионным реакциям.

Ингибирование роста опухоли.

Анализ ингибирования роста опухоли (TGI) оценивает разницу в средних объемах опухолей (MTV) у подвергнутых лечению и контрольных мышей. Для этого исследования конечной точкой для определения TGI был день 29, когда контрольные мыши достигали среднего объема опухоли 1500 мм<sup>3</sup>. MTV (n), средний объем опухоли для числа животных, n, в день анализа TGI, определяли для каждой группы. Процент ингибирования роста опухоли (% TGI) определяли как разницу между MTV указанной контрольной группы и MTV группы, получавшей лекарственное средство, выраженную в процентах от MTV контрольной группы.

Набор данных для анализа TGI включал в себя всех мышей в группе, кроме тех, которые умерли из-за связанных с лечением (TR) или не связанных с лечением (NTR) причин до дня анализа TGI.

В настоящем исследовании Ab1 и Ab2 оценивали отдельно и в комбинации с анти-PD-1 в мышинной сингенной модели C57BL/6 карциномы толстой кишки MC38 мыши. У мышей, которым вводили Ab2 в комбинации с анти-PD-1, наблюдались значительные значения TGI в день 29 ( $P < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни), что оказало положительный эффект на выживаемость, которая статистически значимо отличалась от контрольных, подвергнутых воздействию наполнителем, с использованием логрангового критерия в анализе выживаемости ( $P < 0,05$ , логранговый критерий) (смотрите фиг. 16). Мыши, получавшие Ab1 или Ab2 в комбинации с крысиным контрольным антителом IgG2a, характеризовались регрессионными ответами 1 CR и 1 PR, соответственно. В сочетании с анти-PD-1 регрессионными ответами Ab1 и Ab2 были 1 PR и 1 CR и 4 CR, соответственно. Ab2 в сочетании с анти-PD-1 давал значительную кратковременную эффективность в день 29 и давал общее преимущество в выживаемости в этом 60-дневном исследовании TGD на мышинной сингенной модели C38BL/6 карциномы толстой кишки мыши MC38.

Пример 12. In vivo эффекты Ab3 на выживаемость в комбинации с ингибитором PD-1 в TGFβ1/3-модели.

EMT-6 представляет собой модель ортотопической опухоли мыши, в которой лечение ингибитором иммунной контрольной точки само по себе показало ограниченное влияние на рост опухоли и выживаемость. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что в некоторых моделях сингенных опухолей экспрессируются множественные изоформы TGFβ, как оценивается с помощью RNAseq. Как TGFβ1, так и TGFβ3 являются доминантными в EMT-6 (смотрите фиг. 21), которые экспрессируются в почти равных количествах. Авторы настоящего изобретения, следовательно, делают вывод, что в этой конкретной модели пан-ингибитор изоформ TGFβ может обеспечивать более широкую эффективность in vivo по сравнению с селективным в отношении изоформы ингибитором.

Дизайн исследования.

Чтобы проверить эту гипотезу, самкам мышей Balb/c в возрасте 8-12 недель инъецировали 0,1 мл содержащих  $5 \times 10^6$  клеток рака молочной железы EMT6 в 0% матригеле подкожно в бок. В течение всего исследования каждые две недели проводили мониторинг животных для измерения массы и размера опухоли. Когда опухоли достигли объема 30-80 мм<sup>3</sup>, животных рандомизировали на 6 групп и начинали дозированное введение следующим образом: группа 1: HuNeg-rIgG1/HuNeg-mIgG1; группа 2: анти-PD1-rIgG1/HuNeg-mIgG1; группа 3: анти-PD1-rIgG1/пан-TGFβ Ab-mIgG1; группа 4: анти-PD1-rIgG1/Ab3-mIgG1; группа 5: HuNeg-rIgG1/пан-TGFβ Ab-mIgG1 и группа 6: HuNeg-rIgG1/Ab3-mIgG1. Клоном анти-PD1 был RMP1-14 (BioXCell), который вводили в дозе 5 мг/кг два раза в неделю. HuNeg-rIgG1 использовали в качестве изотипического контроля и вводили аналогично. Ab3-mIgG1 вводили в дозе 30 мг/кг один раз в неделю, а HuNeg-mIgG1 вводили аналогичным образом. Пан-TGFβ Ab-mIgG1 дозированно вводили в дозе 5 мг/кг два раза в неделю. Все дозы выполняли внутривенно в 10 мл/кг. Когда опухоли превышали 2000 мм<sup>3</sup>, животных умерщвляли, собирали сыворотку, опухоль удаляли и быстро замораживали для последующего анализа. Ни одно животное не было умерщвлено из-за значительной потери массы тела, и одно животное в группе 2 было обнаружено мертвым (не определено, что оно связано с лечением).

Результаты.

EMT6 является моделью быстро прогрессирующей сингенной опухоли. Животные группы 1 и группы 6 имели медиану выживаемости 18 дней, что типично для эффекта лечения в этой модели. Из-

вестно, что анти-PD1 оказывает ограниченный эффект в этой модели и, как таковой, увеличивал медиану выживаемости до 19,5 дней при введении отдельно (группа 2). Группа 5 также имела небольшое увеличение медианы выживаемости до 21 дня. В группе 4 наблюдалось умеренное увеличение выживаемости до 25 дней с двумя животными, все еще живыми на 34 день. В группе 3 было только 3 случая смерти к 34 дню, что указывает на значительный эффект на выживаемость этой комбинации. Ингибирование TGF $\beta$ 1 посредством введения одного Ab3-mIgG1 не оказывало влияния на рост объема опухоли, однако в сочетании с анти-PD1 5 животных показали более медленный рост опухоли и одно животное продемонстрировало полный ответ. Одно антитело пан-TGF $\beta$  замедлило рост опухоли у 3 животных, но в комбинации с анти-PD1 у 4 животных наблюдался значительно более медленный рост опухоли, а у 5 животных отмечался полный ответ. Эти результаты согласуются с общедоступной информацией, например, с базой данных RNAseq по всей опухоли (Crown Bioscience MuBase), показывающей, что опухоли EMT6 демонстрируют почти одинаковые уровни экспрессии TGF $\beta$ 1 и TGF $\beta$ 3.

Пример 13. Влияние Ab2 и Ab3 на почечные биомаркеры и фиброз в модели односторонней окклюзии мочеточника (UUO).

Модель односторонней окклюзии мочеточника мыши широко использовалась для изучения интерстициального фиброза, распространенного патологического процесса, который может приводить к терминальной стадии заболевания почек (смотрите Isaka et al. (2008) *Contrib. Nephrol.* 159: 109-21 и Chevallier (1999) *Pediatr. Nephrol.* 13: 612-9). Мыши UUO характеризуются активацией почечных миофибробластов, тубулярной атрофией и интерстициальным фиброзом с минимальным поражением клубочков (смотрите Lian et al. (2011) *Acta Pharmacol. Sin.* 32: 1513-21). Считается, что повышенная экспрессия TGF $\beta$ 1 играет роль в фенотипе, наблюдаемом у мышей UUO. Чтобы оценить влияние Ab2 на презентацию интерстициального фиброза на мышечной модели UUO, проводили следующий эксперимент.

Вкратце, 7-8-недельным самцам мышей CD-1 (Charles River Laboratories) в 4 группах мышей (n=10) вводили либо Ab2 (3 мг/кг или 30 мг/кг; объем дозировки 10 мл/кг), мышечное контрольное антитело IgG1 (30 мг/кг; объем дозировки 10 мл/кг) или PBS, в качестве контроля наполнителя, внутривенно (i.p.) до хирургического вмешательства. Лечение проводили за один день до операции (d-1), через один день после операции (d1) и через 3 дня после операции (d3). В день 0 (d0) мышей анестезировали изофлурановой анестезией на носовом конусе и проводили лапаротомию с последующей постоянной правой односторонней операцией UUO. Дополнительной контрольной группой мышей (n=8) вводили PBS, как описано выше, но они переносили только ложную хирургическую операцию (т.е. лапаротомию без окклюзии мочеточника). Сразу после завершения хирургического вмешательства все мыши получали одну подкожную инъекцию 0,001 мг/кг бупренорфина. Мышей умерщвляли через пять дней после операции, а ткани собирали для анализа. После сбора обе почки помещали в охлажденный льдом 0,9% NaCl, дескапсулировали и взвешивали. Оценивали содержание гидроксипролина для оценки содержания коллагена в почечной ткани. Содержание гидроксипролина в почках, маркера тканевого фиброза и отложения коллагена, были значительно повышены у мышей, которым проводили хирургическое вмешательство, по сравнению с мышами, подвергнутыми ложному хирургическому вмешательству.

Средний поперечный срез каждой правой почки фиксировали погружением в 10% нейтральный забуференный формалин на 48 ч, который затем переносили в 70% этанол для гистологической обработки и анализа. Фиксированные срезы почек заключали в парафин, делали срезы (три последовательных среза по 5 мкм, полученные на расстоянии 200-250 мкм на почку животного для обеспечения лучшего отбора проб и представления повреждений почек), окрашивали пикросириусом красным и подвергали количественному гистологическому анализу с использованием сегментации цветового спектра для определения объемной доли кортикального коллагена (CVF). Один составной балл CVF рассчитывали для каждого животного путем определения среднего балла CVF для каждого из трех серийных срезов. Статистический анализ проводили с использованием непарного t-критерия. Как показано на фиг. 12K, почечный кортикальный фиброз, как определено с помощью CVF, был увеличен в UUO-обструцированных почках по сравнению с контрольными подвергнутыми ложному хирургическому вмешательству мышами. У мышей, получавших либо 3 мг/кг, либо 30 мг/кг Ab2, наблюдалось значительное ослабление индуцированного UUO увеличения CVF по сравнению с мышами, получавшими либо контроль наполнителя (PBS), либо контроль IgG.

Определяли относительные уровни экспрессии мРНК ингибитора-1 активатора плазминогена (PAI-1), фактора роста соединительной ткани (CTGF), TGF $\beta$ 1, фибронектина-1, актина  $\alpha$ -гладких мышц ( $\alpha$ -SMA), хемотаксического белка 1 моноцитов (MCP-1), альфа 1 коллагена типа I (Col1a1) и цепи альфа 1 коллагена типа III (Col3a1) в собранной ткани почки (фиг. 12A-12H). Уровни мРНК были нормализованы с использованием уровней мРНК гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы 1 (HPRT1) гена домашнего хозяйства. Кроме того, у мышей, получавших 3 мг/кг или 30 мг/кг Ab2 до хирургического вмешательства, уровни мРНК PAI-1, CTGF, TGF $\beta$ 1, фибронектина 1, Col1a1 и Col3a1 были значительно снижены по сравнению с мышами, получавшими 30 мг/кг контроля IgG1. У мышей, получавших 3 мг/кг Ab2 до хирургического вмешательства, уровни мРНК  $\alpha$ -SMA были значительно снижены по сравнению с мышами, получавшими 30 мг/кг контроля IgG1. Кроме того, у мышей, получавших 30 мг/кг Ab2 до хирургическо-

го вмешательства, уровни мРНК MCP-1 были значительно снижены по сравнению с мышами, получавшими 30 мг/кг контроля IgG1.

Также оценивали влияние Ab3 на уровни экспрессии мРНК известных маркеров фиброза. Как показано на фиг. 12I и 12J, у мышей, получавших 3 мг/кг или 30 мг/кг Ab3 до хирургического вмешательства, уровни мРНК PAI-1 и Colla1 были значительно снижены по сравнению с мышами, получавшими контроль IgG1.

Таким образом, наблюдались значительные эффекты у мышей, получавших Ab2 или Ab3, на модели мышей UUO, за исключением уровней гидроксипролина. Как показано на фиг. 12A-12H и 12K, воздействие Ab2 значительно ослабляло индуцированное UUO увеличение CVF и значительно снижало экспрессию генов известных маркеров фиброза, таких как PAI-1, CTGF, TGF $\beta$ 1, фибронектин 1, Colla1 и Col3a1. Аналогично, как показано на фиг. 12I-12J, воздействие Ab3 значительно снижало экспрессию генов известных маркеров фиброза, таких как PAI-1 и Colla1. Эти данные демонстрируют, что TGF $\beta$ 1 является основной формой TGF $\beta$ , играющей роль при заболевании почек, и что, к удивлению, TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3, вероятно, не участвуют в патогенезе.

Пример 14. Влияние специфичного к TGF $\beta$ 1, независимого от контекста антитела на мышиную модель синдрома Альпорта почечного фиброза.

Мышиная модель Col4a3<sup>-/-</sup> представляет собой установленную генетическую модель аутосомно-рецессивного синдрома Альпорта. У мышей с синдромом Альпорта отсутствует функциональный коллаген 4 A3 (Col4a3<sup>-/-</sup>), и поэтому они не могут образовывать коллаген типа IV, для которого необходимы цепи  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4 и  $\alpha$ 5. У мышей Col4a3<sup>-/-</sup> развивается фиброз в почках в соответствии с почечным фиброзом у людей, включая в себя гломерулосклероз, интерстициальный фиброз и канальцевую атрофию, и у всех мышей Col4a3<sup>-/-</sup> развивается терминальная стадия почечной недостаточности (ESRD) в возрасте от 10 до 30 недель, в зависимости от генетического фона мыши. Структурные и функциональные проявления почечной патологии у мышей Col4a3<sup>-/-</sup> в сочетании с прогрессированием ESRD делают мышей Col4a3<sup>-/-</sup> идеальной моделью для понимания фиброза почек. Предыдущие сообщения указывают на важность сигнального пути TGF $\beta$  в этом процессе, и сообщалось, что лечение либо интегрином  $\alpha$ V $\beta$ 6, известным активатором TGF $\beta$ , либо ловушкой лиганда TGF $\beta$ , предотвращает фиброз почек и воспаление у мышей с синдромом Альпорта (Nahm et al. (2007) *The American Journal of Pathology*, 170(1): 110-125).

Ab3, который представляет собой специфичный к изоформе, независимый от контекста ингибитор активации TGF $\beta$ 1, исследовали на его способность ингибировать или смягчать почечный фиброз у мышей с синдромом Альпорта следующим образом.

Потомство F1 от 129:B16 гетерозиготного скрещивания (модель со средним прогрессированием) использовали для исследования. Дозированное введение антитела для Ab3 начиналась через шесть недель после рождения, в дозе 5 мг/кг, два раза в неделю (т.е. 10 мг/кг/неделя) в течение периода исследования, составляющего шесть недель. Нейтрализующее пан-TGF $\beta$  антитело использовали в качестве положительного контроля (дозировка 5 мг/кг два раза в неделю), тогда как IgG использовали в качестве отрицательного контроля. Все антитела вводили внутривентриально. Через шесть недель лечения антителами (12 недель после рождения) животных умерщвляли и почки собирали для анализов.

Хорошо задокументировано, что активация рецептора TGF $\beta$  приводит к последующему сигнальному каскаду внутриклеточных событий, включая в себя фосфорилирование Smad2/3. Поэтому эффекты лечения антителами Ab3 оценивали в образцах лизата почки путем измерения относительных уровней фосфорилирования Smad2/3, как было проанализировано с помощью ИФА (Cell Signaling) в соответствии с инструкциями производителя. На фиг. 15 представлен график, показывающий относительные соотношения фосфорилированного и общего (фосфорилированного и нефосфорилированного) Smad2/3. Лизаты цельной почки, полученные из образцов животных, подвергнутых лечению Ab3, показали значительное снижение относительного фосфорилирования Smad2/3 по сравнению с отрицательным контролем. Средние отношения были эквивалентны таковым из гетерозиготного контроля.

У 12-недельных мышей F1 с синдромом Альпорта, описанных выше, были ранние признаки фиброза почек на момент завершения исследования, измеренные как по отложению коллагена (количественная оценка с помощью пикросириуса красного), так и по накоплению азота мочевины в крови (BUN), каждый из которых свидетельствует о фиброзе. В соответствии с ингибирующей активностью Ab3, наблюдаемой при последующей передаче сигналов рецептора TGF $\beta$ , ткани, обработанные Ab3, демонстрировали уменьшение признаков фиброза. Например, средний уровень BUN для контрольных животных с синдромом Альпорта, которые не получали лечение Ab3, был выше 50 мг/дл, в то время как средний уровень BUN у животных, получавших Ab3, был снижен до уровня менее чем 30 мг/дл, что позволяет предположить, что Ab3 способен к улучшению фиброза.

Пример 15. Влияние специфичного к TGF $\beta$ 1, независимого от контекста антитела на фиброз печени, вызванный четыреххлористым углеродом.

Активность TGF $\beta$ , по-видимому, играет роль в патологии фиброза органов, такого как фиброз печени. Ранее сообщалось, что растворимое средство TGFBRII предотвращает фиброз печени в модели фиброза печени с использованием четыреххлористого углерода (CCl<sub>4</sub>) (Yata et al., *Hepatology*, 2002).

Точно так же антисмысловое ингибирование TGFβ1 (посредством доставки аденовируса) ослабляет фиброз печени из-за лигации желчных протоков (Arias et al., BMC Gastroenterology, 2003). Кроме того, было показано, что 1D11, пан-TGFβ антитело, которое нейтрализует все изоформы TGFβ, снижает фиброз печени и холангиокарциномы у крыс, получавших TAA (Ling et al., PLoS ONE, 2013).

В настоящем документе, модель индуцированного тетрахлоридом углерода (CCl4) фиброза печени у мышей использовали для оценки влияния независимого от контекста ингибитора активации TGFβ1 на фиброз *in vivo*. Фиброз печени индуцировали у самцов мышей BALB/c посредством CCl4, который давали два раза в неделю в течение шести недель *i.p.* После первых двух недель воздействия CCl4 животных лечили еженедельной терапевтической дозой Ab3 (30 мг/кг). Терапевтическое дозирование антител начинали через две недели и продолжали в течение четырех недель.

Животных рандомизировали на основании данных химии крови. В течение четырехнедельного дозированного введения Ab3 отбирали образцы крови для анализа АСТ/АЛТ в сыворотке и анализа общего билирубина. Животных взвешивали два раза в неделю для контроля массы тела во время исследования. После шестинедельного исследования печень и селезенку собирали и взвешивали для определения соотношения массы печени и селезенки. Патологию печени оценивали гистологически на окрашенных пикросирусом красным срезах печени. Степень фиброза печени оценивали в соответствии со срезами, окрашенными по Массону или пикросирусом красному, и рассматривали под объективом с 10- или 20-кратным увеличением на всем срезе с использованием перечисленных ниже критериев.

Таблица 14

## Критерии оценки фиброза

Оценка	Утолщение центральной вены (CLV)	Межсинусоидальная вена (PS)	Воротная вена (PT)	Фиброз Области вовлечения (NS) Слой волокон (WS)
0	Нормальное	Отсутств.	Отсутств.	Отсутств.
1	Слегка утолщенное	Очаговое	Среднее количество	≤ 6 слоев тонкий и не связанный
2	Умеренно утолщенное	Умеренное количество	Умеренное количество	≤ 6 слоев тонкий и не связанный
3	Неразличимое	Обширное количество	Цирроз	Образование узелков Толстая фиброзная ткань
4	—	—	—	>2/3 среза

Фиброзные баллы затем рассчитывали по формуле  $SSS=CLV+PS+PT+2\times(NS\times WS)$ , которая учитывает утолщение центральной вены, межсинусоидальную вену, воротную вену, а также пораженные участки и слои ткани.

Как показано на фиг. 14, четыре еженедельные дозы лечения Ab3 значительно снижали CCl4-индуцированный фиброз печени.

Аналогично, антифиброзные эффекты Ab2 и Ab3 при многократных дозах (3, 10 и 30 мг/кг) исследовали посредством гистологического количественного определения (% площади) окрашивания пикросирусом красным в фиксированных формалином, заключенных в парафин срезах одной доли печени. Количественное определение выполнялось патологом в слепой манере. В соответствии с наблюдением, представленным выше, срезы печени животных, обработанных антителами, показали значительное снижение CCl4-индуцированного фиброза, измеренного окрашиванием пикросирусом красным, которое соответствует относительным количествам тканевого коллагена. Результаты показали, что каждый из Ab2 и Ab3 был эффективен в снижении фиброза печени даже при самой низкой исследованной дозе (3 мг/кг). Более конкретно, животные, получавшие CCl4, которые получали лечение Ab2 в дозе 3 мг/кг, снижали объемную долю коллагена (% площади) до 2,03% по сравнению с контролем IgG (3,356%) ( $p<0,0005$ ). Точно так же животные, получавшие CCl4, которые получали лечение Ab3 в дозе 3 мг/кг, уменьшали объемную долю коллагена (% площади) до 1,92% по сравнению с контролем IgG (3,356%) ( $p<0,0005$ ). Двойные отрицательные контрольные животные, которые не получали воздействие CCl4, демонстрировали объемную долю фонового коллагена 1,14%.

Кроме того, предварительные данные указывают на то, что воздействие Ab3 вызывало значительное снижение уровней фосфорилированного SMAD2/3, что измеряли с помощью ИФА как отношение фосфо-SMAD2/3 к общему SMAD2/3, что указывает на то, что нисходящий путь передачи сигнала TGFβ был супрессирован введением независимого от контекста ингибитора TGFβ1 *in vivo*.

Пример 16. Роль TGFβ1 в мышечной дистрофии.

TGFβ играет множественную роль в функции скелетных мышц, включая в себя ингибирование миогенеза, регуляцию воспаления и восстановление мышц, а также продвижение фиброза. Хотя существует значительный интерес к ингибированию TGFβ как терапии для широкого спектра заболеваний,

включая в себя мышечные дистрофии, эти способы лечения ингибируют TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3 независимо от молекулярного контекста. Отсутствие специфичности/селективности этих ингибиторов может привести к нежелательным побочным эффектам, приводящим к клиническим дозам с недостаточной эффективностью. Хотя сообщалось, что ингибирующие пан-TGF $\beta$  молекулы улучшают мышечную функцию и уменьшают фиброз у мышей mdx, вопрос о том, вызваны ли эти эффекты инактивацией TGF $\beta$ 1,  $\beta$ 2 или  $\beta$ 3, еще не решен.

С этой целью были созданы антитела, которые специфично блокируют опосредованную интегрин-опосредованную активацию латентного TGF $\beta$ 1, сохраняя при этом TGF $\beta$ 2 и P3. Мышей D2.mdx подвергали воздействию специфичными антителами к про-TGF $\beta$ 1, чтобы установить роль TGF $\beta$ 1 специфично в восстановлении мышц дистрофической мышцы. Оценивают функциональное влияние ингибирования TGF $\beta$ 1 на защиту от повреждения, вызванного сокращением, а также на восстановление после того же способа повреждения. Гистологическая оценка включает в себя то, влияет ли лечение на повреждение мышц, фиброз и воспаление. Кроме того, может быть оценена возможная токсичность для определения того, являются ли наблюдаемые негативные эффекты, о которых сообщается при ингибировании пан-TGF $\beta$  в мышцах (например, усиление воспаления, долговременный дефицит мышечной функции), результатом ингибирования TGF $\beta$ 1 или TGF $\beta$ 2/3. Чтобы понять, является ли ингибирование TGF $\beta$ 1 в определенных молекулярных контекстах более эффективным и/или имеет меньше негативных эффектов (нежелательных явлений), можно оценить эффективность ингибиторов LTBP-про-TGF $\beta$  1 в этой модели, чтобы разобраться в роли презентуемого иммунной клеткой TGF $\beta$ 1 из презентуемых во внеклеточном матриксе (ECM), потенциально приводя к более безопасным и/или более эффективным противофиброзным способам лечения.

Дистрофическая мышца очень восприимчива к вызванному сокращением повреждению. После повреждения мышца мышей mdx демонстрирует значительное снижение генерации силы и повышенное поглощение красителя Эвана синего, что свидетельствует о физическом повреждении/нарушении мышечного волокна, по сравнению с WT (Lovering, R.M., et al., Arch Phys Med Rehabil, 2007. 88(5): p. 617-25). Терапевтические средства, которые уменьшают степень вызванного сокращением повреждения или улучшают восстановление после повреждения, будут характеризоваться значительным клиническим преимуществом для пациентов с мышечной дистрофией (Bushby, K., et al., Lancet Neurol, 2010. 9(1): p. 77-93). Исследуемые ингибиторы, такие как Ab1, Ab2 и Ab3, могут оцениваться по их способности: i) предотвращать вызванное сокращением повреждение, а также ii) способствовать восстановлению после повреждения. Штамм D2.mdx может быть использован для экспериментов авторов настоящего изобретения, в отличие от традиционного штамма mdx на фоне B10. Эти мыши, полученные путем скрещивания mdx на фоне DBA2/J, содержат описанный выше не-защитный вариант LTBP4 и, следовательно, характеризуются патологией заболевания, которая является более тяжелой, прогрессирующей и сходной с заболеванием человека, чем стандартный штамм mdx (Coley, W.D., et al., Hum Mol Genet, 2016. 25(1): p. 130-45). Поскольку используют мышей D2.mdx, мыши DBA2/J могут служить в качестве контролей дикого типа. Поскольку DMD поражает преимущественно самцов, исследования могут быть сосредоточены на самцах мышей.

Чтобы исследовать способность Ab1 и Ab2 предотвращать/ограничивать индуцированное сокращением повреждение, 6-недельным самцам мышей D2.mdx (n=10) вводили 10 мг/кг/неделю любого из контроля IgG, Ab1, или Ab2 в течение 6 недель. Для сравнения с опубликованной работой с использованием ингибитора пан-TGF $\beta$  четвертой группе вводят дозу 10 мг/кг/неделю 1D11. Все антитела характеризуются изотипом mIgG1, и ранее было показано, что эта доза эффективна в модели UUO (фиг. 12A-12K). Группу WT, получавшую контроль IgG, также включали. За 24 ч до умерщвления мышам вводят 1% краситель Эванса синий (EBD) в PBS (объем 1% массы тела) для оценки повреждения мышечных волокон с помощью флуоресцентной микроскопии. В конце лечения мышей подвергают протоколу эксцентрического сокращения *in vivo*. Эксцентрическое повреждение икроножной мышцы может быть выполнено с помощью системы мышечного рычага 305B (Aurora Scientific), как описано (Khairallah, R.J., et al., Sci Signal, 2012. 5 (236): p. Ra56). Вкратце, выполняется 20 эксцентрических сокращений с 1-минутными паузами между ними, и снижение пиковой изометрической силы до эксцентрической фазы может быть принято как показатель повреждения мышц. Может быть определена степень потери силы и процент EBD положительных волокон. Мыши DBA2/J, подвергнутые этому протоколу, теряют 30-40% начальной силы после 20 эксцентрических сокращений. Напротив, мыши D2.mdx теряют 80% начальной силы, следуя тому же протоколу, как описано ранее (Pratt, S.J., et al., Cell Mol Life Sci, 2015. 72(1): p. 153-64; Khairallah, R.J., et al., Sci Signal, 2012. 5(236): p. ra56). Может быть оценена способность Ab1 и Ab2 уменьшать потерю силы после повреждения. Мышей умерщвляют в конце эксперимента, и поврежденные и неповрежденные икроножные мышцы можно собирать для гистологического анализа. Поглощение EBD можно оценить по обоим мышцам. Может быть измерена площадь поперечного сечения мышечного волокна и степень фиброза. Для определения площади поперечного сечения срезы мышцы средней части живота могут быть окрашены агглютинином из проростков пшеницы, конъюгированным с флуорофором для визуализации клеточных мембран. Срезы могут быть оцифрованы с использованием флуоресцентной

микроскопии, границы клеток прослежены с помощью прогностического программного обеспечения, а площадь поперечного сечения определена с помощью несмещенных автоматических измерений. Для анализа фиброза срезы можно окрашивать пикросириусом красным (PSR) и рассчитывать площадь PSR+ на предметное стекло.

Оценивают способность Ab1, Ab2 или Ab3 ускорять восстановление после вызванного сокращением повреждения. Мыши DBA2/J и D2.mdx в возрасте 12 недель могут подвергаться такому же протоколу эксцентрического сокращения, описанному выше. После повреждения мышцей разделяют на группы лечения (n=10) и вводят либо контроль IgG (для мышей WT и D2.mdx), 1D11, Ab1, Ab2 или Ab3 (только D2.mdx). Антитела можно дозировать в дозе 10 мг/кг/неделю в течение всего эксперимента. Через 7 и 14 дней после повреждения можно измерить максимальную пиковую изометрическую силу, соотношение между сокращением и тетанией и соотношение силы и частоты, чтобы оценить влияние лечения на восстановление после повреждения. В то время как Ab1, Ab2 и Ab3 ингибируют высвобождение TGFβ1 независимо от презентующей молекулы, селективное высвобождение TGFβ1 из внеклеточного матрикса (т.е. презентуемого LTBP) может иметь большее преимущество при DMD благодаря сохранению TGFβ1-управляемой активности Treg. Чтобы ответить на этот вопрос, можно также оценить специфичные антитела, ингибирующие LTBP-про-TGFβ1, как на способность предотвращать вызванное сокращением повреждение, так и ускорять восстановление после повреждения.

Пример 17. Роль TGFβ1 в скелетных мышцах после острого повреждения.

Может быть исследована роль TGFβ1, в частности, в регенерации мышечных волокон после повреждения мышц. Специфичные к TGFβ1 антитела могут быть использованы в модели повреждения кардиотоксином для определения роли TGFβ1 конкретно во время регенерации мышечных волокон. Регенерацию можно оценить гистологически, и можно провести функциональные оценки мышечной силы и качества. Принимая во внимание потенциальные преимущества ингибирования TGFβ1 для регенерации мышц, терапия, которая оказывает благоприятные эффекты без токсичности, наблюдаемой при ингибировании пан-TGFβ, будет очень полезной. Это позволяет исследовать влияние специфичного ингибирования TGFβ1 на функцию сателлитных клеток и может дать представление об исследованиях трансплантации сателлитных клеток.

Как описано выше, TGFβ, по-видимому, оказывает множественное влияние на мышечную биологию, включая в себя ингибирование пролиферации и дифференцировки миообластов, а также стимуляцию атрофии и фиброза (Allen, R.E. and L.K. Boxhorn, *J Cell Physiol*, 1987. 133(3): p. 567-72; Brennan, T.J., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991. 88(9): p. 3822-6; Massague, J., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986. 83(21): p. 8206-10; Olson, E.N., et al., *J Cell Biol*, 1986. 103(5): p. 1799-805; Li, Y., et al., *Am J Pathol*, 2004. 164(3): p. 1007-19; Mendias, C.L., et al., *Muscle Nerve*, 2012. 45(1): p. 55-9; Nelson, C.A., et al., *Am J Pathol*, 2011. 178(6): p. 2611-21). Однако в этих исследованиях либо использовали рекомбинантный TGFβ1 в культуре, либо инъецировали мышам, что может иметь нефизиологические результаты, поскольку фактор роста удаляют из его молекулярного контекста. Альтернативно, исследователи использовали ингибиторы TGFβ, которые не являются селективными в отношении TGFβ1.

Для оценки специфичных к изоформе, пермиссивных по отношению к контексту эффектов TGFβ1, множественные антитела к про-TGFβ1 (например, Ab3) могут быть исследованы на их способность влиять на регенерацию мышц после повреждения, вызванного СТХ. Эти антитела представляют собой "специфичные к изоформе" и "пермиссивные по отношению к контексту" ингибиторы активации TGFβ1, так что они специфично ингибируют высвобождение TGFβ1 (в отличие от TGFβ2 или TGFβ3) из любой презентующей молекулы и не связываются со зрелыми факторами роста (фиг. 4B).

Мышечная регенерация может быть индуцирована у самцов мышей DBA2/J (n=10) посредством инъекции СТХ в правую икроножную мышцу. За один день до повреждения мышам можно вводить 10 мг/кг контрольного IgG, 1D11, Ab1 или Ab2. Антитела продолжают вводить еженедельно до конца исследования. Через 7 и 14 дней после повреждения измерения силы мышц могут быть проведены *in vivo* с помощью системы мышечных рычагов 305C (Aurora Scientific Inc., Aurora, CAN). Вкратце, для группы мышц подошвенного сгибателя стопы сокращения вызывают чрескожной электрической стимуляцией седалищного нерва у анестезированных мышей, и затем серию стимуляций выполняют с возрастающей частотой стимуляции (пульс 0,2 мс, длительность передачи 500 мс): 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 Гц с последующей окончательной стимуляцией при 1 Гц. Будет определена максимальная пиковая изометрическая сила, отношение между сокращением и тетанией и соотношение сила-частота. После измерения силы поврежденные икроножные и подошвенные мышцы собирают и готовят к гистологии. Площадь поперечного сечения мышечного волокна и площадь %PSR+ могут быть определены, как описано в примере 8 выше.

Лечение Ab3 может привести к снижению фиброза и улучшению мышечной функции. Однако, учитывая роль TGFβ1 в регуляции иммунной активации, возможно, что можно наблюдать усиление воспаления с антителами, как сообщалось при лечении 1D11 (Andreetta, F., et al., *J Neuroimmunol*, 2006. 175(1-2): p. 77-86). В случае, если усиление воспаления может ограничивать терапевтические эффекты ингиби-

рования TGF $\beta$ 1, специфичные к контексту антитела могут быть впоследствии оценены для обеспечения дополнительной степени специфичности, которая может ограничивать токсичность. Например, можно использовать антитела, которые ингибируют высвобождение TGF $\beta$ 1 только из LTBP, используя показания и способы, описанные выше. Эти антитела могут ограничивать высвобождение TGF $\beta$ 1 только из ЕСМ, не влияя на высвобождение из Treg или макрофагов.

Пример 18. Выбор подходящих ингибиторов TGF $\beta$ 1 при мышечных нарушениях.

Анализ экспрессии про-TGF $\beta$ 1 и презентующих его молекул в здоровой, регенерирующей и больной мышце может предоставить полезную информацию для помощи в выборе оптимального терапевтического подхода. Учитывая потенциальные преимущества ингибирования TGF $\beta$ 1 в регенерации и восстановлении мышц, понимание контекста презентации про-TGF $\beta$ 1 (например, в ЕСМ или на иммунных клетках) в скелетных мышцах в различных условиях (здоровых, остро поврежденных и хронически поврежденных) может помочь информировать о терапевтической полезности антител и, в конечном итоге, дает представление о степени специфичности/селективности, необходимой для достижения как клинической эффективности, так и безопасности. Характер презентации TGF $\beta$ 1 может варьировать в зависимости от состояния здоровья мышц и в течение заболевания, что может иметь значение для любой терапии, нацеленной на TGF $\beta$ 1. Понимание профилей экспрессии этих молекул также поможет в выборе подходящего времени дозирования для потенциальных терапевтических молекул. С помощью вестерн-блоттинга, иммуногистохимии и иммунопреципитации экспрессия про-TGF $\beta$ 1 и презентующих его молекул может быть оценена в нормальной, остро поврежденной (повреждение кардиотоксином) и хронически регенерирующей (мышь D2.mdx) мышце. Экспрессия этих молекул может быть исследована конкретно в ключевых типах клеток или подмножестве типов клеток (например, в сателлитных клетках, макрофагах, фиброадипогенных предшественниках и т.д.) в различных условиях, описанных выше.

Хотя экспрессию изоформ TGF $\beta$  исследовали в мышцах от мышей mdx, предыдущая работа была сосредоточена на экспрессии зрелых факторов роста (Nelson, C.A., et al., *Am J Pathol*, 2011. 178(6): p. 2611-21; Zhou, L., et al., *Neuromuscul Disord*, 2006. 16(1): p. 32-8). Учитывая целевую специфичность описанных в настоящем документе антител к TGF $\beta$ 1, важно, чтобы профили экспрессии были исследованы не только для зрелых и про-TGF $\beta$ 1, но также и для презентующих молекул, что должно предоставлять информацию относительно источника и/или контекста пула представляющего интерес TGF $\beta$ 1. В идеале желательно получить представление о профилях экспрессии латентных комплексов, а не только о каждом компоненте.

Антитела подвергают скринингу посредством вестерн-блоттинга и ИНС на представляющую интерес мишень. Антитела к мышечному TGF $\beta$ 1-LAP, LTBP1, LTBP3 и LTBP4 являются коммерчески доступными. Антитело к TGF $\beta$ 1-LAP (клон TW7-16B4) тщательно характеризовали, и оно является эффективным как для проточной цитометрии, так и для вестерн-блоттинга (Oida, T. and H.L. Weiner, *PLoS One*, 2010. 5(11): p. e15523). Антитела к LTBP1 (ProteinTech # 22065-1-AP) и LTBP3 (Millipore # ABT316) проверили внутри компании с использованием клеток SW480, трансфицированных LTBP1-про-TGF $\beta$ 1 или LTBP3-про-TGF $\beta$ 1, и показали, что они специфичны к своим мишеням. Применимость этих антител для ИНС может быть определена. Из мышц от здоровых мышей и мышей D2.mdx делают срезы, а антитела исследуют на замороженных и FFPE срезах. Антитела могут быть проверены путем включения условий с 100-кратным избытком очищенного целевого белка или комплекса (сделанного собственными силами), чтобы гарантировать, что наблюдаемый сигнал является специфичным.

В предыдущей работе идентифицировали антитела, которые специфично связываются с данным латентным комплексом, но не обладают ингибирующей активностью. Связывание антигена этими антителами было подтверждено с помощью ИФА (фиг. 4C) и может также быть оценено на их применимость в ИНС (учитывая трехмерную структуру этих эпитопов, эти антитела вряд ли будут эффективны в качестве реагентов вестерн-блоттинга). Присутствие латентных комплексов TGF $\beta$ 1 из объемной ткани также можно оценить с помощью вестерн-блоттинга или иммунопреципитации. Латентные комплексы можно идентифицировать с помощью вестерн-блоттинга, используя тот же образец в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. При восстанавливающих условиях TGF $\beta$ 1, LAP и презентующая молекула разделяются, и эти три молекулы могут быть идентифицированы по одному и тому же блоттингу, но с использованием двухцветных способов вестерн-блоттинга. В невосстанавливающих условиях комплекс LAP:презентующая молекула остается связанным, пока высвобождается TGF $\beta$ 1; комплекс мигрирует медленнее, чем пустая презентующая молекула, и мигрирует вместе с TGF $\beta$ 1-LAP. Различные антитела также оценивают по их способности иммунопреципитировать латентные комплексы из мышц, чтобы продемонстрировать прямое связывание TGF $\beta$ 1 со специфичными презентующими молекулами.

После определения подходящих антител оценивают экспрессию в здоровых, регенерирующих и дистрофических мышцах с помощью вестерн-блоттинга и/или ИНС, в зависимости от доступных антител. Передняя большеберцовая мышца (ТА) и мышца диафрагмы могут быть собраны у мышей DBA2/J и D2.mdx в возрасте 4, 8 и 12 недель. Для регенерирующих мышц кардиотоксин может быть введен в ТА

мышей DBA2/J в возрасте 12 недель, а мышцы собраны через 3, 7 и 14 дней после повреждения. Ткань по меньшей мере от 4 мышечных может быть использована для каждого состояния/момента времени. Можно также проводить эксперименты по совместному окрашиванию для идентификации популяций клеток, экспрессирующих различные молекулы (например: CD11b для макрофагов, FoxP3 для Treg, MyoD для миогенных клеток).

Пример 19. Ab2 и Ab3 проявляют сниженную токсичность по сравнению с ингибитором киназы ALK5 LY2109761 и пан-TGFβ антителом.

Для оценки токсичности Ab2 и Ab3 по сравнению с низкомолекулярным ингибитором киназы LY2109761 рецептора TGF-β типа I (ALK5) и с антителом к TGFβ (hIgG4), проводили исследования токсичности на крысах. Крыса была выбрана в качестве вида для этого исследования безопасности на основе предыдущих сообщений о том, что крысы более чувствительны к ингибированию TGFβ по сравнению с мышами. Сходная токсичность, наблюдаемая у крыс, также наблюдается у других видов млекопитающих, таких как собаки, отличные от человека приматы, а также люди.

А. Фаза I исследования.

Вкратце, самкам крыс F344/NHsd вводили либо Ab2 в дозе 3 мг/кг (1 группа, n=5), в дозе 30 мг/кг (1 группа, n=5) или в дозе 100 мг/кг (1 группа, n=5); пан-TGFβ антитело в дозе 3 мг/кг (1 группа, n=5), в дозе 30 мг/кг (1 группа, n=5) или в дозе 100 мг/кг (1 группа, n=5); LY2109761 в дозе 200 мг/кг (1 группа, n=5) или 300 мг/кг (1 группа, n=5); или PBS (pH 7,4), контроль-наполнитель (1 группа, n=5). Животным, получавшим либо Ab2, пан-TGFβ антитело, либо контроль-наполнитель, вводили один раз внутривенно (в день 1), а крысам, получавшим LY2109761, вводили пероральный зонд один раз в день в течение 7 дней (7 доз). Массу тела животного определяли в дни 1, 3 и 7 фазы дозирования. Животных умерщвляли на 8 день и проводили вскрытия.

Как показано в данных выживания, показанных на фиг. 17A, Ab2 показал пониженную токсичность по сравнению с другими группами лечения. Все животные, которым вводили 300 мг/кг ингибитора киназы ALK5 LY2109761, были умерщвлены в умирающем состоянии или найдены мертвыми на 3, 6 или 7 дни исследования. Два животных, которым вводили 200 мг/кг LY2109761, были найдены мертвыми на 7 день исследования. Одно животное, которому вводили 100 мг/кг пан-TGFβ антитела, было обнаружено мертвым на 6 день исследования. Все животные, которым вводили до 100 мг/кг Ab2, выживали до конечного умерщвления.

Аналогично, как показано в данных выживания, показанных на фиг. 19A, крысы, получавшие Ab3, проявляли пониженную токсичность по сравнению с другими группами лечения. Животное, которому вводили 100 мг/кг пан-TGFβ антитела, было обнаружено мертвым на 6 день исследования. Все животные, которым вводили до 100 мг/кг Ab3, выживали до конечного умерщвления.

Кроме того, токсичность воздействий оценивали путем мониторинга массы тела животных во время фазы дозирования. Как показано на фиг. 18B-18E, животные, получавшие LY2109761 в дозе 200 мг/кг или 300 мг/кг, демонстрировали снижение массы тела в ходе исследования.

Массу органа животного также оценивали после умерщвления. Как показано в табл. 11, увеличение массы сердца наблюдалось у животных, которым вводили ≥ 200 мг/кг LY2109761. Увеличение массы сердца также наблюдалось у животных, которым вводили ≥ 30 мг/кг антитела пан-TGFβ. У животных, которым вводили до 100 мг/кг Ab2 или Ab3, влияния на массу органа не наблюдалось.

Таблица 11

	Изменения массы органа в группах лечения					
	Контроль-наполнитель <sup>а</sup>	Группа лечения				
Величина дозы (мг/кг/день)		0	200	300	3	30
Сердце						
Абсолютная масса (г)	0,4084	112	NE	99	123	119
Соотношение массы тела (%)	0,3952	132	NE	96	122	122
Массовый коэффициент мозга (%)	26,3420	113	NE	98	123	116

NE = не оценивалось из-за ранней смертности.

<sup>а</sup> Контроль-наполнитель = фосфатно-солевой буфер (PBS), pH 7,4.

Примечание. Значения абсолютной массы и соотношения массы органов (по отношению к телу или мозгу) для каждой группы лечения выражены в процентах от контрольного среднего значения.

В то время как никаких макроскопических результатов не наблюдалось у животных, которым вводили до 100 мг/кг Ab2 или пан-TGFβ антитела, аномальная форма грудины наблюдалась у четырех животных каждой группы лечения, получавших либо 200 мг/кг, либо 300 мг/кг LY2109761. 2,5 мл прозрачной жидкости в грудной полости и увеличение тимуса из-за избытка жидкости (т.е. отека) наблюдали у одного животного, которому вводили 300 мг/кг LY2109761, который был обнаружен мертвым на 3-й день исследования.

Как показано в табл. 12, на микроскопическом уровне у животных, которым вводили 200 мг/кг LY2109761, обнаруживались нарушения сердечного клапана (т.е. вальвулопатия). Вальвулопатия характеризовалась утолщением сердечного клапана вследствие кровоизлияния, эндотелиальной гиперплазии, смешанных инфильтратов воспалительных клеток и/или стромальной гиперплазии (смотрите фиг. 18F, верхняя правая панель). У большинства животных было несколько пораженных клапанов. Кроме того, были обнаружены нарушения предсердия, в том числе минимальные или незначительные смешанные инфильтраты воспалительных клеток, минимальное кровоизлияние и/или минимальная гиперплазия эндотелия (эндокарда), приводящая к усилению базофильного окрашивания предсердия в срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Нарушения миокарда также наблюдались в основном в основании сердца и состояли из минимальной или легкой дегенерации/некроза, небольшого кровоизлияния и/или незначительных смешанных инфильтратов воспалительных клеток. У одного животного, которому вводили 300 мг/кг LY2109761, был легкий некроз с воспалением коронарной артерии. Кроме того, два животных, которым вводили 200 мг/кг LY2109761, характеризовались минимальными смешанными инфильтраты воспалительных клеток или кровоизлиянием в корень аорты.

Таблица 12  
Микроскопические нарушения сердца у животных, получающих LY2109761

Величина дозы (мг/кг/день)	LY2109761		
	0	200	300
<b>Сердце</b>			
<u>Клапаны сердца</u>			
Вальвулопатия			
Минимальная	0	1	2
Слабая	0	3	3
Умеренная	0	1	0
<u>Предсердие</u>			
Инфильтрат, смешанно-клеточный			
Минимальный	0	2	3
Слабый	0	0	1
Гиперплазия, эндотелий			
Минимальная	0	1	3
Кровоизлияние			
Минимальное	0	1	2
<u>Миокард</u>			
Дегенерация/некроз			
Минимальный	0	0	1
Слабый	0	1	1
Кровоизлияние			
Слабое	0	1	0
Инфильтрат, смешанно-клеточный			
Слабый	0	0	1
<u>Коронарная артерия</u>			
Некроз с воспалением			
Слабый	0	0	1
<u>Корень аорты</u>			
Кровоизлияние			
Минимальное	0	1	0
Инфильтрат, смешанно-клеточный			
Минимальный	0	1	0

Как показано в табл. 13 и на фиг. 22, у животных, которым вводили приблизительно 3 мг/кг пан-TGF антитела, обнаруживались нарушения сердечного клапана (т.е. вальвулопатия), подобные тем, которые описаны у животных, которым вводили LY2109761, как описано выше (смотрите также фиг. 17F, нижняя левая панель). У животных, которым вводили 30 мг/кг пан-TGFβ антитела, обнаруживали нарушения предсердия, аналогичные тем, которые описаны у животных, которым вводили LY2109761. У животных, которым вводили 100 мг/кг пан-TGFβ антитела, обнаруживали нарушения миокарда, сходные с описанными у животных, которым вводили LY2109761, и у животных, которым вводили 30 мг/кг пан-TGFβ антитела, наблюдалось кровоизлияние в миокард. У одного животного, которому вводили 100 мг/кг пан-TGFβ антитела, был умеренный очаговый некроз с кровоизлиянием в коронарную артерию, что было связано с легкими периваскулярными инфильтратами со смешанными воспалительными клетками. Нарушения костей у животных, которым вводили пан-TGFβ антитело и LY2109761, состояли из макроскопической аномальной формы грудины и микроскопической увеличенной толщины гипертрофической зоны в концевой пластине грудины и эпифиза бедренной кости и большеберцовой кости; эти нарушения имели более высокую частоту и/или тяжесть у животных, которым вводили LY2109761, по сравнению с пан-TGFβ антителом.

Таблица 13

## Микроскопические нарушения сердца у животных, получающих пан-TGFβ антитело

Величина дозы (мг/кг/день)	Пан-TGFβ антитело			
	0	3	30	100
<b>Сердце</b>				
<u>Клапаны сердца</u>				
Вальвулопатия				
Минимальная	0	2	0	0
Слабая	0	2	4	5
Умеренная	0	0	1	0
<u>Предсердие</u>				
Инфильтрат, смешанно-клеточный				
Минимальный	0	0	1	2
Слабый	0	0	1	1
Гиперплазия, эндотелий				
Минимальная	0	0	3	1
Кровоизлияние				
Минимальное	0	0	1	0
<u>Миокард</u>				
Дегенерация/некроз				
Слабый	0	0	0	2
Кровоизлияние				
Минимальное	0	0	2	1
Слабое	0	0	1	1
Инфильтрат, смешанно-клеточный, основание				
Слабый	0	0	0	1
<u>Коронарная артерия</u>				
Некроз с кровоизлиянием				
Умеренный	0	0	0	1
Инфильтрат, смешанно-клеточный, периваскулярный				
Слабый	0	0	0	1

Несмотря на то что минимальные или незначительные нарушения сердечных клапанов имели место у небольшого числа животных, которым вводили Ab2, эти нарушения считали маловероятно связанными с исследуемым изделием, с низкой частотой (у животных и количеством сердечных клапанов в животном), отсутствием ответа на дозу и/или отсутствие одновременных нарушений костей.

## В. Фаза II исследования.

На второй фазе исследования самок крыс распределяли по группам и вводили либо Ab2 в дозе 3 мг/кг (1 группа, n=5), либо в дозе 30 мг/кг (1 группа, n=5), либо в дозе 100 мг/кг (1 группа, n=5); Ab3 в дозе 3 мг/кг (1 группа, n=5), 30 мг/кг (1 группа, n=5), 100 мг/кг (1 группа, n=5) или 60 мг/кг (1 группа, n=5); LY2109761 в дозе 200 мг/кг (1 группа, n=5); или PBS (pH 7,4) (1 группа, n=5), как обсуждалось выше. Животным, получавшим Ab2, Ab3 или контроль-наполнитель, вводили внутривенно один раз в неделю в течение 4 недель в объеме 10 мл/кг, а крысам, получавшим LY2109761, вводили пероральный зонд один раз в день в течение пяти дней. Животных умерщвляли и проводили вскрытия.

Аналогично наблюдениям на первой фазе исследования, исследуемые связанные с исследуемым изделием нарушения сердца, наблюдались в течение более короткого периода времени (то есть 5 дней вместо 7 дней) у животных, которым вводили 200 мг/кг LY2109761. Микроскопические нарушения сердца были связаны с увеличением массы сердца у животных, которым вводили 200 мг/кг LY2109761 или  $\geq 3$  мг/кг пан-TGFβ антитела.

Хотя минимальные или незначительные нарушения сердечного клапана наблюдались у небольшого числа животных фазы II, которым вводили Ab2 или Ab3, эти нарушения считались маловероятно связанными с исследуемым изделием, из-за низкой частоты возникновения (у животного и количеством сердечных клапанов в животном), отсутствием доза-ответ и/или отсутствием параллельных результатов костей.

Дополнительные ткани оценивали в фазе II; микроскопические нарушения не были приписаны Ab2 или Ab3. Однако микроскопические нарушения были обнаружены в костях (грудина, бедренная кость и большеберцовая кость), печени, поджелудочной железе (артерии), тимусе, щитовидной железе, женских репродуктивных тканях (яичник, матка, шейка матки и влагалище) и молочной железе животных II фазы, которым вводили 200 мг/кг LY2109761. Нарушения тимуса состояли из минимально или слегка уменьшенных лимфоцитов в коре, что коррелировало с макроскопически маленьким тимусом и уменьшением массы тимуса. Уменьшенные лимфоциты тимуса соответствовали первичному эффекту исследуемого изделия или представляли собой вторичный стрессовый эффект (т.е. повышенное содержание эндогенных глюкокортикоидов). Минимальная гипертрофия фолликулярных клеток щитовидной железы, кото-

рая коррелировала с увеличением массы щитовидной железы, соответствовала индукции ферментов печени, что приводило к увеличению метаболизма тироксина. Увеличение массы печени у животных, которым вводили LY2109761, наводит на мысль об индукции фермента печени, но у них не было микроскопического коррелята. Микроскопические нарушения в женских репродуктивных тканях и молочной железе соответствовали уменьшению циклов эструса и коррелировали с уменьшением массы матки. У некоторых животных также наблюдались нарушения молочных желез, характеризующиеся лобулярной гиперплазией/гипертрофией альвеолярных и/или протоковых эпителиальных клеток (т.е. маскулинизацией), что соответствовало снижению уровня эстрогена.

#### С. Заключение исследования.

В заключение, животные, получавшие Ab2 и Ab3 во всех исследуемых дозах (3 мг/кг, 30 мг/кг или 100 мг/кг) в течение 4 недель, не проявляли токсических эффектов по сравнению с фоном ни по одному из следующих параметров: дегенерация или некроз миокарда, кровоизлияние в предсердие, кровоизлияние в миокард, кровоизлияние в клапан, гиперплазия эндотелия клапана, гиперплазия стромы клапана, смешанный инфильтрат воспалительных клеток в сердечных клапанах, минерализация, некроз с кровоизлиянием в коронарную артерию, некроз с воспалением в коне аорты, некроз или воспалительный клеточный инфильтрат в кардиомиоцитах и вальвулопатия. Таким образом, воздействие специфическими к изоформе ингибиторами активации TGF $\beta$ 1 неожиданно приводило к значительно улучшенным профилям безопасности, например, к снижению смертности и снижению кардиотоксичности по сравнению с воздействием пан-TGF $\beta$  ингибитором (например, ингибитором ALK5-киназы LY2109761 или пан-TGF $\beta$  антителом).

#### Пример 20. Селективность в отношении изоформ Ab3 *in vivo*.

Для подтверждения селективного в отношении изоформы ингибирования TGF $\beta$ 1 *in vivo* проводили фармакодинамическое исследование, в котором оценивали влияние Ab3 на уровни тонического фосфо-SMAD2/3 в клетках бронхоальвеолярного лаважа (BAL), собранного от здоровых крыс. В литературе сообщается, что в гомеостатических условиях клетки BAL преимущественно экспрессируют TGF $\beta$ 2/3, но мало TGF $\beta$ 1, тогда как последний становится преимущественно повышенным при патологических состояниях.

Здоровых крыс Sprague Dawley (в возрасте приблизительно 6-8 недель, весом 200-250 г в начале исследования; Charles River) рандомизировали по массе тела в исследуемые группы и воздействовали описанными ниже дозами.

Животные получали исследуемые антитела (huNEG-mIgG1, антитело к интегрину P6, или Ab3) в дни 1, 8 и 15 путем внутрибрюшинной инъекции. Животных умерщвляют в день 16 для сбора BAL и сыворотки. Одной группе контрольных животных вводили однократную дозу перорального зонда (PO) LY2109761 (низкомолекулярный ингибитор ALK5) в дозе 100 мг/кг и подвергали эвтаназии через 2 ч (+/- 20 мин) после введения доз для сбора BAL.

Для сбора образцов BAL целое легкое трижды промывали 5,0 мл охлажденного на льду физиологического раствора Дульбекко с фосфатным буфером. Лаважи объединяли и сразу помещали на влажный лед до следующей обработки. Небольшую часть (100-150 мкл) из каждого образца откладывали на льду для подсчета клеток. Оставшиеся образцы центрифугировали при 1300 g (2-8°C) в течение  $\geq$ 10 мин. Клеточные осадки сразу же помещали на лед. 250 мкл свежеприготовленного ледяного буфера для лизиса pSMAD использовали для лизиса осадков. Лизированные образцы центрифугировали при 14000 g в течение 10 мин (2-8°C). Полученный супернатант разделяли на аликвоты и немедленно замораживали в жидком азоте или на сухом льду.

Образцы сыворотки обрабатывали центрифугированием при 2500 g, температуре 2-8°C, в течение 10 мин. Образцы сыворотки замораживали при температуре от -70 до -90°C.

Анализ фосфо-SMAD2/3 выполняли с помощью ИФА (Cell Signaling Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Результаты оценивали по соотношению фосфорилированного SMAD2/3 к общему количеству. Как показано на фиг. 20, тоническая передача сигналов SMAD2/3 была значительно супрессирована у животных, получавших либо низкомолекулярный пан-TGF $\beta$  ингибитор, LY2109761, либо моноклональное антитело к  $\beta$ 6-цепи интегрина, которое блокирует опосредованную интегрином активацию TGF $\beta$ 1/3. Для сравнения, животные, подвергнутые воздействию антителом, специфичным к изоформе TGF $\beta$ 1, Ab3, поддерживали уровни тонического фосфорилирования в клетках BAL, подтверждая мнение о том, что Ab3 способен избирательно ингибировать активацию TGF $\beta$ 1 без нарушения гомеостатической функции TGF $\beta$ 2 или TGF $\beta$ 3 *in vivo*.

Пример 21. Ab3: новое и высокоспецифичное ингибирующее TGF $\beta$ 1 антитело с антифибротической активностью.

Трансформирующий фактор роста- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) выполняет разнообразные биологические функции, включая в себя регуляцию иммунных реакций и гомеостаз тканей. Дисрегуляция TGF $\beta$ 1 была ассоциирована с рядом заболеваний, включая в себя фиброз почек, где хроническая активация является основной причиной заболевания. Однако из-за высокой гомологии между фактором роста TGF $\beta$ 1 и его близкими

родственниками TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3 истинно специфичные к TGF $\beta$ 1 ингибиторы остаются неясными. С другой стороны, пан-TGF $\beta$  ингибирование может вызывать ограничивающие дозу вальвулопатии сердца, что приводит к проблемам с токсичностью при длительном приеме. TGF $\beta$  экспрессируются в виде пробелков, которые протеолитически расщепляются на N-концевой продомен и C-концевой фактор роста. Продомен остается нековалентно связанным с фактором роста, предотвращая связывание рецептора. Этот латентный комплекс TGF $\beta$  находится на клетках или во внеклеточном матриксе до тех пор, пока комплекс не активируется интегринными, освобождая фактор роста и позволяя связываться с рецептором. Для идентификации специфичных к TGF $\beta$ 1 антител нацеливали продомен, который характеризуется гораздо более низкой гомологией с TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3, чем фактор роста. Идентифицировали моноклональное антитело Ab3, которое специфично связывается с латентным TGF $\beta$ 1, без обнаруживаемого связывания с латентным TGF $\beta$ 2 или TGF $\beta$ 3. Было показано, что Ab3 блокирует активацию латентного TGF $\beta$ 1 посредством интегринов  $\alpha$ V $\beta$ 6 или  $\alpha$ V $\beta$ 8, обеспечивая специфичность, которая не достигается биологическими факторами, которые нацелены на взаимодействие фактора роста TGF $\beta$ 1/рецептора. Ab3 связывает и ингибирует латентный TGF $\beta$ 1 в комплексе со всеми четырьмя известными презентующими TGF $\beta$  молекулами, позволяя нацеливать латентный TGF $\beta$ 1 во множестве тканей. Ab3 блокирует активацию эндогенного TGF $\beta$ 1 в ряде первичных клеток, включая в себя дермальные миофибробласты и печеночные звездчатые клетки. Наконец, эффективность *in vivo* ингибирования TGF $\beta$ 1 с помощью этого нового механизма исследовали на модели UO фиброза почек, показав, что Ab3 супрессирует маркеры фиброза до уровней, сходных с уровнями, достигнутыми у животных, получавших пан-TGF $\beta$ -антитело. Взятые вместе, эти данные демонстрируют, что ингибирование активации латентного TGF $\beta$ 1 эффективно в модели доклинического фиброза и характеризуется более высоким профилем безопасности по сравнению с пан-TGF $\beta$  ингибированием.

Пример 22. Высокоспецифичное ингибирование активации TGF $\beta$ 1 антителом Ab1, обладающим антифибротической активностью.

Трансформирующий фактор роста- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) представляет собой цитокин с важными и разнообразными биологическими функциями, включая в себя регуляцию иммунных реакций и гомеостаз тканей. TGF $\beta$  экспрессируются в виде пробелков, которые протеолитически расщепляются на N-концевой продомен и C-концевой фактор роста. Секретируемый фактор роста остается нековалентно связанным с продоменом, предотвращая связывание рецептора и передачу сигналов. Латентный TGF $\beta$ 1 ковалентно связан с презентующими молекулами через дисульфидные связи, которые связывают латентный TGF $\beta$ 1 с внеклеточным матриксом или с клеточной поверхностью. На сегодняшний день идентифицированы четыре презентующие TGF $\beta$  молекулы (LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33). Эти презентующие молекулы играют критическую роль в активации латентного комплекса, поскольку они обеспечивают якорь для интегринов, чтобы оказывать тяговое усилие на латентный TGF $\beta$ 1, таким образом высвобождая активный фактор роста. Дисрегуляция активации TGF $\beta$ 1 была связана с рядом патологий, включая в себя фиброзные заболевания, где хроническая активация TGF $\beta$ 1 управляет трансдифференцировкой миофибробластов и сверхэкспрессией белков внеклеточного матрикса. Роль TGF $\beta$ 1 в управлении фиброзом привела к разработке множества терапевтических средств для ингибирования его активности. Однако было обнаружено, что ингибирование сильными антителами к пан-TGF $\beta$  вызывает дозозимитирующие вальвулопатии сердца, что приводит к опасениям относительно токсичности этого терапевтического подхода. Альтернативная стратегия специфичного нацеливания на TGF $\beta$ 1 осложняется высокой гомологией между фактором роста TGF $\beta$ 1 и его близкими родственниками TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3. Нацеливали продомен TGF $\beta$ 1, который характеризуется гораздо более низкой гомологией с продоменами TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3, и идентифицировали Ab3, полностью человеческое моноклональное антитело, которое специфично связывается и ингибирует активацию латентного TGF $\beta$ 1 без видимого связывания с латентным TGF $\beta$ 2 или TGF $\beta$ 3. Этот новый механизм делает возможной специфичность к изоформе, не достигаемой биологическими веществами, которые связывают и блокируют взаимодействие фактора роста/рецептора TGF $\beta$ 1 и предотвращают латентную активацию TGF $\beta$ 1 как интегринными  $\alpha$ V $\beta$ 6, так и  $\alpha$ V $\beta$ 8. Ab3 связывает и ингибирует латентный TGF $\beta$ 1 в комплексе со всеми четырьмя известными презентующими TGF $\beta$  молекулами, позволяя направлять латентный TGF $\beta$ 1 во многие ткани. Ab3 ингибирует эндогенный TGF $\beta$ 1 в ряде первичных клеток *in vitro*, включая в себя дермальные миофибробласты и печеночные звездчатые клетки. Кроме того, эффективность *in vivo* ингибирования TGF $\beta$ 1 посредством этого нового механизма исследовали на модели односторонней обструкции мочеточника при фиброзе почек. Обнаружено, что Ab3 супрессирует индукцию профибротических генов до уровней, сходных с уровнями, достигнутыми у животных, получавших пан-TGF $\beta$  антитело. Взятые вместе, эти данные демонстрируют, что ингибирование активации латентного TGF $\beta$ 1 эффективно в модели доклинического фиброза и имеет потенциально более высокий профиль безопасности по сравнению с пан-TGF $\beta$  ингибированием.

Пример 23. Биоинформационный анализ относительных экспрессий TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3.

Для оценки экспрессии изоформ TGF $\beta$  в раковых опухолях исследовали данные по экспрессии генов (RNAseq) из общедоступных наборов данных. Используя общедоступный инструмент онлайн-интерфейса (Firebrowse) для изучения экспрессии изоформ TGF $\beta$  в Атласе ракового генома (TCGA), сна-

чала исследовали дифференциальную экспрессию РНК, кодирующей изоформы TGF $\beta$ , как в нормальной, так и в раковой ткани. Отбирали все наборы данных опухолевых RNAseq в базе данных TCGA, для которых имелись компараторы нормальной ткани, и исследовали экспрессию генов TGFB1, TGFB2 и TGFB3 (фиг. 21A). Данные из интерфейса Firebrowse представлены в виде log<sub>2</sub> считываний на миллион т.п.н. (RPKM).

Эти данные свидетельствуют о том, что в большинстве типов опухолей (серые) TGFB1 является наиболее широко экспрессируемым транскриптом изоформ TGF $\beta$ , причем значения log<sub>2</sub> (RPKM), как правило, находятся в диапазоне 4-6, против 0-2 для TGFB2 и 2-4 для TGFB3. Авторы настоящего изобретения также отмечают, что в некоторых типах опухолей средний уровень экспрессии как TGFB1, так и TGFB3 повышен по сравнению с нормальными образцами сравнения (черный), что позволяет предположить, что повышенная экспрессия этих изоформ TGF $\beta$  может быть связана с раковыми клетками. Из-за потенциальной роли передачи сигналов TGF $\beta$  в супрессии иммунной системы хозяина в микроокружении рака, авторам настоящего изобретения было интересно отметить, что транскрипты TGFB1 были повышены при типах рака, для которых одобрена анти-PD1 или анти-PDL1 терапия - эти показания помечены как серый на фиг. 21A.

Следует обратить внимание, что хотя RPKM > 1, как правило, считается минимальным значением, связанным с биологически релевантной экспрессией генов (Hebenstreit et al., 2011; Wagner et al., 2013), однако для последующих анализов использовали более строгие ограничения RPKM (или связанной меры FPKM (смотрите Conesa et al, 2016)) > 10 или > 30, чтобы избежать ложных срабатываний. Для сравнения все три из этих порогов указаны на фиг. 21A.

Большие межквартильные диапазоны на фиг. 21A указывают на значительную вариабельность экспрессии изоформы TGF $\beta$  у отдельных пациентов. Чтобы идентифицировать злокачественные новообразования, где по меньшей мере в подгруппе популяции пациентов имеются опухоли, которые дифференциально экспрессируют изоформу TGFB1, анализировали данные RNAseq из отдельных образцов опухолей в наборе данных TCGA, рассчитывая количество фрагментов на миллион т.п.н. (FPKM). RPKM и FPKM приблизительно эквивалентны, хотя FPKM корректируется для считываний двойных подсчетов на противоположных концах одного и того же транскрипта (Conesa et al., 2016). Образцы опухолей оценивали как положительные в отношении экспрессии TGFB1, TGFB2 или TGFB3, если значение FPKM в транскрипте составляло >30, и рассчитывали фракцию пациентов (выраженную в %) каждого типа рака, которая экспрессировала каждую изоформу TGF $\beta$  (фиг. 21B).

Как показано на фиг. 21B, большинство типов опухолей в наборе данных TCGA показывают значительный процент отдельных образцов, которые являются TGFB1-положительными, с некоторыми типами рака, включая в себя острый миелоидный лейкоз, диффузную В-крупноклеточную лимфому и плоскоклеточный рак головы и шеи, экспрессирующими TGFB1 более чем в 80% всех образцов опухолей. В соответствии с данными на фиг. 21A, меньшее количество типов рака являются положительными в отношении TGFB2 или TGFB3, хотя некоторые виды рака показывают равный или больший процент образцов опухолей, которые являются положительными в отношении TGFB3, включая в себя инвазивную карциному молочной железы, мезотелиому и саркому. Эти данные предполагают, что типы рака могут быть стратифицированы по экспрессии изоформы TGF $\beta$ , и что такая стратификация может быть применима при идентификации пациентов, которые являются кандидатами для лечения специфичными ингибиторами изоформы TGF $\beta$ .

Для дополнительного исследования этой гипотезы данные RNAseq log<sub>2</sub> (FPKM) из подмножества отдельных образцов опухолей наносили на тепловую карту (фиг. 21C), установив порог цвета для отражения FPKM > 30 в качестве минимального уровня транскрипции, чтобы получить оценку "положительный" в отношении изоформы TGF $\beta$ .

Каждый образец представлен в виде одной строки на тепловой карте, и образцы располагаются по уровню экспрессии TGFB1 (самые высокие уровни экспрессии вверху). В соответствии с анализом на фиг. 21B, значительное количество образцов каждого типа рака является положительным в отношении экспрессии TGFB1. Тем не менее, это представление также подчеркивает тот факт, что многие опухоли экспрессируют исключительно транскрипты TGFB1, в частности, при раке пищевода, уротелии мочевого пузыря, аденокарциноме легкого и меланоме кожи. Интересно, что такое искажение TGFB1 не является особенностью всех видов рака, так как образцы от инвазивного рака молочной железы показывают гораздо большее число образцов, которые являются TGFB3-положительными, а не TGFB1-положительными. Тем не менее, этот анализ показывает, что изоформа  $\beta$ 1 является преобладающей, и в большинстве случаев единственным представителем семейства TGF $\beta$ , присутствующим в опухолях у большого числа больных раком. В совокупности с данными, свидетельствующими о том, что передача сигналов TGF $\beta$  играет существенную роль в иммуносупрессии в микроокружении рака, эти данные также указывают на полезность специфичного к TGFB1 ингибирования при лечении этих опухолей.

Чтобы идентифицировать мышинные модели, в которых можно было бы проверить эффективность специфичного к TGFB1 ингибирования в качестве противоопухолевого средства, анализировали экспрессию изоформы TGF $\beta$  в данных RNAseq из различных клеточных линий, используемых в моделях син-

генной опухоли мышцы. Для этого анализа производили два представления данных. Во-первых, аналогично данным на фиг. 3, авторы настоящего изобретения производили тепловую карту значений  $\log_2$  (ФРКМ) для опухолей, полученных из каждой клеточной линии (фиг. 21D, слева). Поскольку этот анализ использовали для идентификации сингенных моделей, экспрессирующих высокий TGF $\beta$ 1, которые являются отрицательными по TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3, авторы настоящего изобретения были в первую очередь заинтересованы в том, чтобы избежать ложных отрицательных значений, и они установили "положительный" порог в виде ФРКМ > 1, значительно ниже, чем в представлениях на фиг. 21B и 21C.

Как ясно показывает представление данных на фиг. 21D (слева), ряд сингенных опухолей, в том числе MC-38, 4T-1 и EMT6, экспрессируют значительные уровни как TGF $\beta$ 1, так и TGF $\beta$ 3. Напротив, модели A20 и EL4 экспрессируют TGF $\beta$ 1 почти исключительно, а опухоли S91 и P815 демонстрируют сильное смещение для экспрессии TGF $\beta$ 1.

Чтобы дополнительно оценить дифференциальную экспрессию TGF $\beta$ 1 по сравнению с TGF $\beta$ 2 и/или TGF $\beta$ 3, рассчитывали  $\min\text{ATGF}\beta 1$ , определенное как меньшее значение  $\log_2(\text{ФРКМ}_{\text{TGF}\beta 1}) - \log_2(\text{ФРКМ}_{\text{TGF}\beta 2})$  или  $\log_2(\text{ФРКМ}_{\text{TGF}\beta 1}) - \log_2(\text{ФРКМ}_{\text{TGF}\beta 3})$ . Значение  $\min\text{ATGF}\beta 1$  для каждой модели показано в виде тепловой карты на фиг. 21D (справа) и подчеркивает вывод из фиг. 21D (слева), что сингенные опухоли из клеточных линий A20, EL4, S91 и/или P815 могут представлять превосходные модели для исследования эффективности специфичных к TGF $\beta$ 1 ингибиторов.

Различные признаки и варианты осуществления настоящего изобретения, указанные в отдельных разделах выше, применимы, при необходимости, к другим разделам соответствующим образом. Следовательно, функции, указанные в одном разделе, могут быть соответствующим образом объединены с функциями, указанными в других разделах.

Специалисты в настоящей области техники распознают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем документе. Такие эквиваленты предназначены для охвата следующей формулой изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в лечении рака, включающего солидные опухоли, где антитело связывает следующие про/латентные комплексы TGF $\beta$ 1:

- i) GARP про-TGF $\beta$ 1;
- ii) LTBP1 про-TGF $\beta$ 1;
- iii) LTBP3 про-TGF $\beta$ 1 и
- iv) LRRC33 про-TGF $\beta$ 1;

причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связывается с TGF $\beta$ 2 или TGF $\beta$ 3 и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют высвобождение зрелого TGF $\beta$ 1 из про/латентного комплекса;

солидная опухоль содержит инфильтрированные ассоциированные с опухолью макрофаги, нейтрофилы, ассоциированные с опухолью, или супрессорные клетки миелоидного происхождения, экспрессирующие комплекс LRRC33-про-TGF $\beta$ 1 на клеточной поверхности.

2. Применение по п.1, причем указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент не связывает свободный зрелый TGF $\beta$ 1, который не ассоциирован с про/латентным комплексом.

3. Применение по любому из предшествующих пунктов, причем солидная опухоль представляет собой десмопластическую опухоль.

4. Применение по любому из предшествующих пунктов, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

5. Применение по любому из предшествующих пунктов, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с комплексом GARP-про-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-про-TGF $\beta$ 1 и комплексом LTBP3-про-TGF $\beta$ 1 с константой диссоциации (KD) между 50 пМ и 100 нМ.

6. Применение по любому из предшествующих пунктов, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с комплексом GARP-про-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP1-про-TGF $\beta$ 1, комплексом LTBP3-про-TGF $\beta$ 1 и комплексом LRRC33-про-TGF $\beta$ 1, каждый из которых имеет константу диссоциации (KD) от 50 пМ до 100 нМ.

7. Применение по любому из предшествующих пунктов, причем указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент снижает супрессорную активность регуляторных Т-клеток.

8. Применение по любому из предшествующих пунктов, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с комплексом GARP-про/латентный TGF $\beta$ 1 и комплексом LRRC33-про/латентный TGF $\beta$ 1 и запускает интернализацию указанного комплекса.

9. Применение по любому из предшествующих пунктов, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается зависимым от рН образом, так что связывание происходит при нейтральном или физиологическом рН, но указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент диссоциирует при кислом рН.

10. Применение по любому из пп.1-9, причем солидная опухоль включает экспрессирующие LRRС33 М2-макрофаги и/или миелоидные клетки-супрессоры в опухолевом микроокружении.

11. Применение по п.10, причем опухолевое микроокружение представляет собой иммуносупрессивную нишу, из которой исключаются противоопухолевые иммунные клетки хозяина.

12. Применение по любому из пп.1-11, причем солидная опухоль включает ассоциированные с опухолью макрофаги, экспрессирующие комплекс LRRС33-про-TGFβ1 и/или регуляторные Т-клетки, экспрессирующие комплекс GARP-про-TGFβ1.

13. Применение по любому из пп.1-12, причем солидная опухоль плохо отвечает или резистентна к терапии рака, выбранной из группы, состоящей из лучевой терапии, химиотерапии и терапии ингибитором контрольной точки.

14. Применение по любому из пп.1-13, причем солидная опухоль характеризуется повышенной жесткостью внеклеточного матрикса.

15. Применение по любому из пп.1-14, где рак связан со сверхэкспрессией одного или нескольких из следующего: PAI-1 (также известный как Serpine 1), MCP-1 (также известный как CCL2), Col1a1, Col3a1, FN1, TGFβ1, CTGF, α-SMA, ITGA11 и ACTA2.

16. Применение по п.15, где рак связан со сверхэкспрессией ACTA2, CTGF и TGFβ1.

17. Применение по любому из пп.1-16, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент используется в комбинированной терапии с ингибитором контрольной точки.

18. Применение по п.17, где ингибитор контрольной точки содержит антагонист PD-1 или PD(L)-1.

19. Применение по любому из предшествующих пунктов, причем антитело или его антигенсвязывающую часть применяют в сочетании с химиотерапией.

20. Применение по любому из предшествующих пунктов, причем антитело или его антигенсвязывающую часть применяют в сочетании с лучевой терапией.

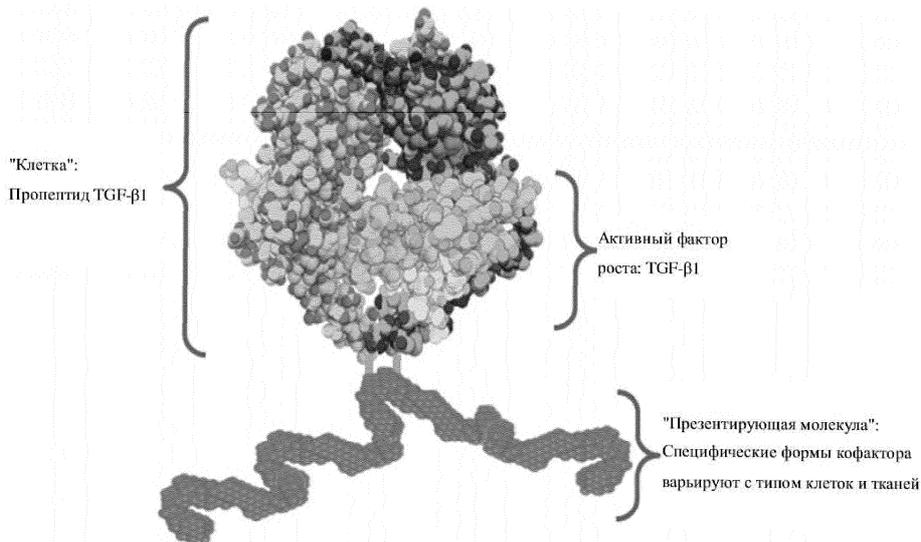
21. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по п.1, включающий стадии: скрининг потенциальных антител или их антигенсвязывающих фрагментов по их способности ингибировать TGFβ1, который ассоциирован с GARP, LRRС33, LTBP1 и LTBP3, и

отбор антител или их антигенсвязывающих фрагментов, способных ингибировать TGFβ1, который ассоциирован с GARP, LRRС33, LTBP1 и LTBP3.

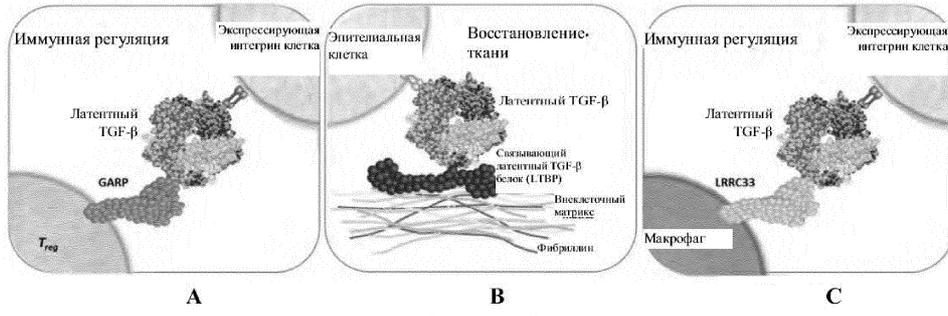
22. Способ по п.21, дополнительно включающий скрининг антитела или антигенсвязывающего фрагмента на специфичность изоформе TGFβ1 с использованием TGFβ2 и/или TGFβ3, причем необязательно антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфично связывает и блокирует активацию TGFβ1, но не TGFβ2 и/или TGFβ3.

23. Способ по п.21 или 22, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с комплексом GARP-про TGFβ1 и комплексом LRRС33-про TGFβ1 и запускает интернализацию указанного комплекса.

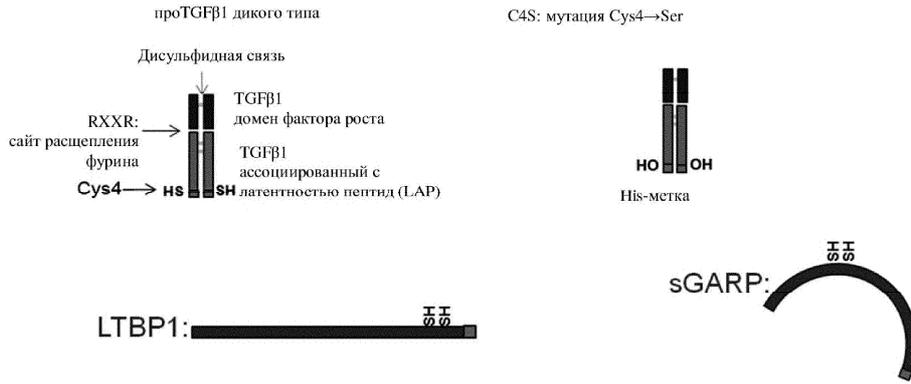
24. Способ по п.21, в котором стадия отбора включает скрининг антитела или антигенсвязывающего фрагмента на способность ингибировать активацию TGFβ1 на основанных на кремнии субстратах с высокой жесткостью.



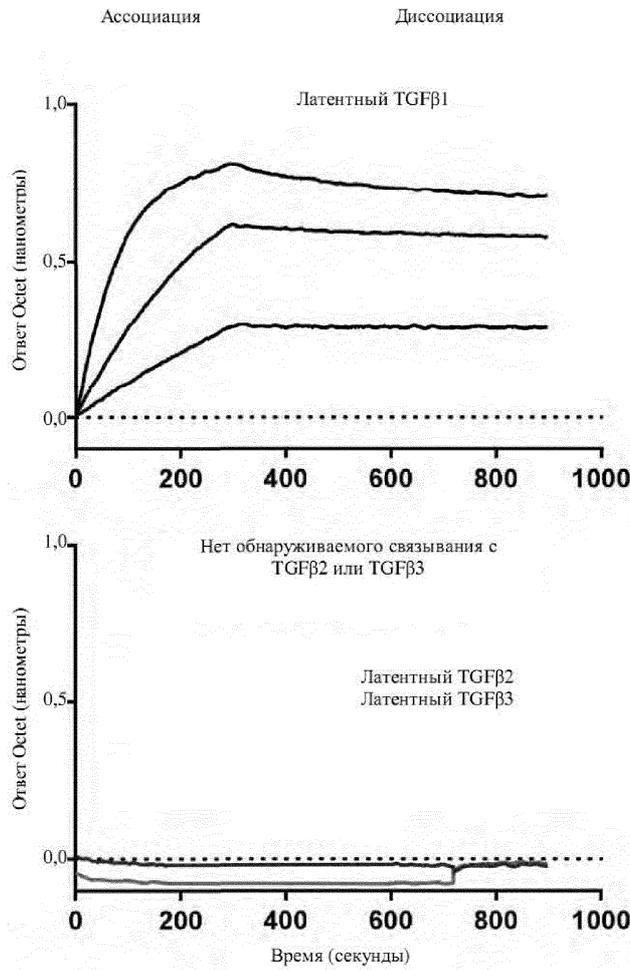
Фиг. 1



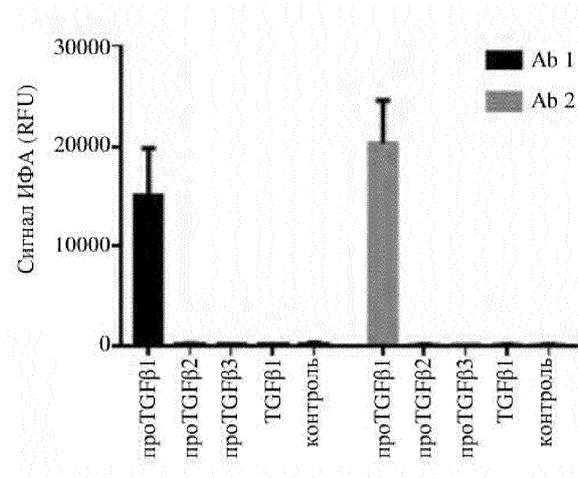
Фиг. 2А-С



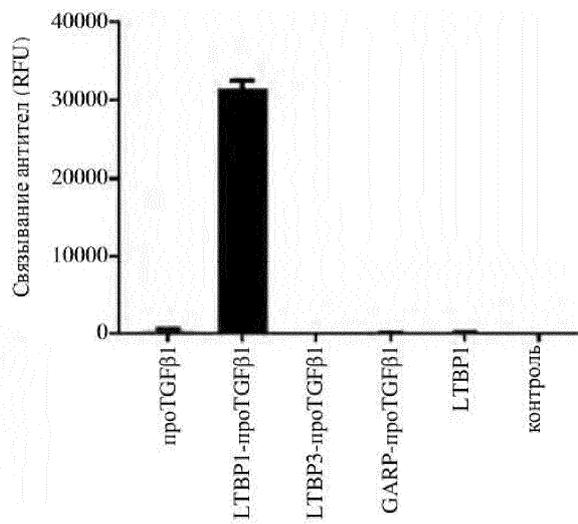
Фиг. 3



Фиг. 4А



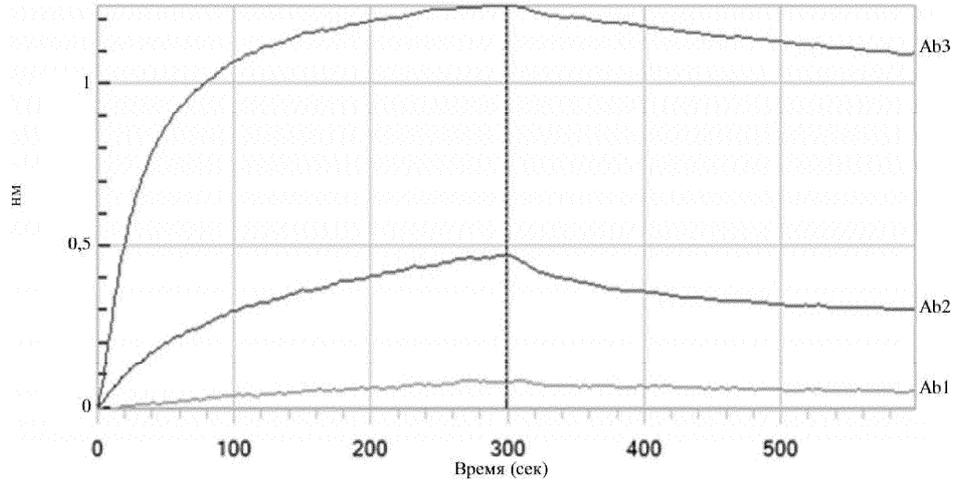
Фиг. 4B



Фиг. 4C

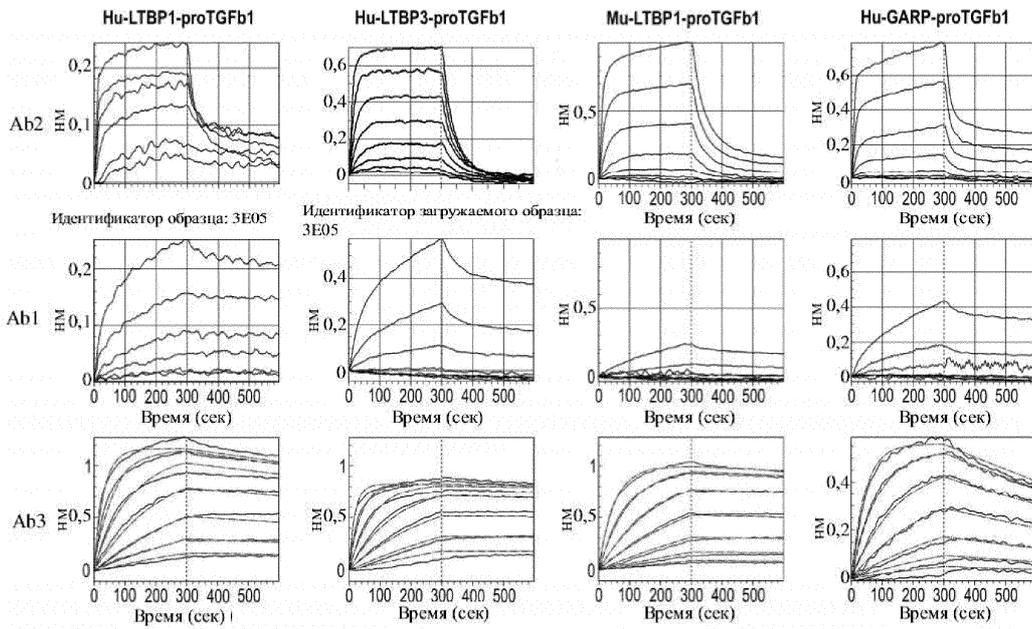
	TGFβ1	TGFβ2	TGFβ3
C2	<1пМ	Нет связ-я	15,2 нМ
C3	<1пМ	23,4	5,6 нМ
C4	<1пМ	<1пМ	18,7 нМ
C5	<1пМ	<1пМ	<1пМ
C6	<1пМ	1,7нМ	<1пМ
C1	<1пМ	2,8нМ	<1пМ

Фиг. 5



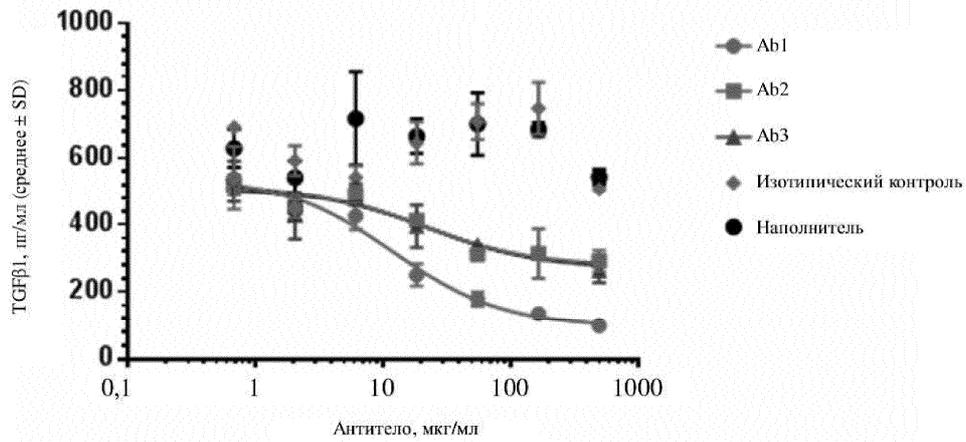
Фиг. 6А

Титрационные кривые: захват Fc - моноклональное антитело - антиген

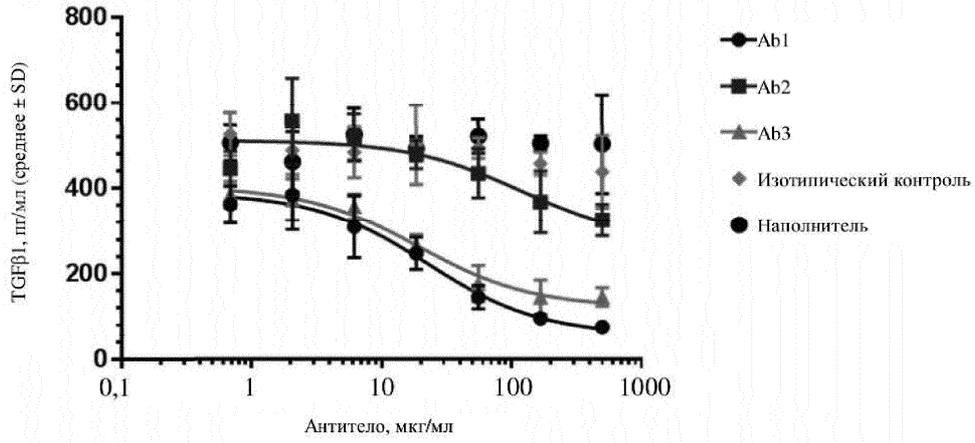


Фиг. 6В

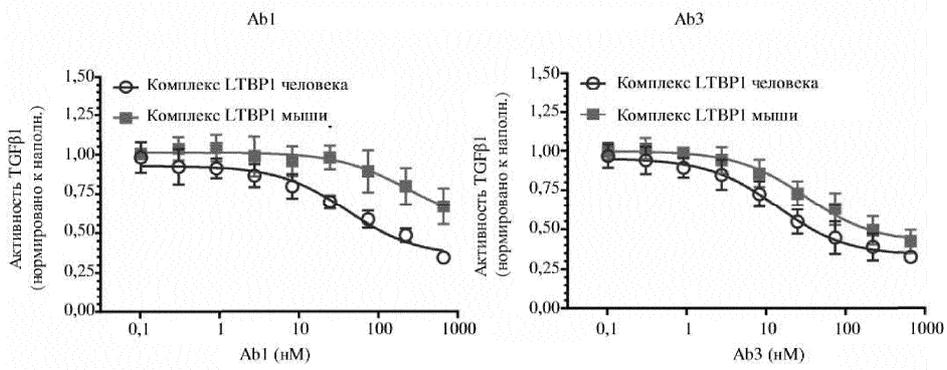
Ингибирование комплекса GARP



Фиг. 7А



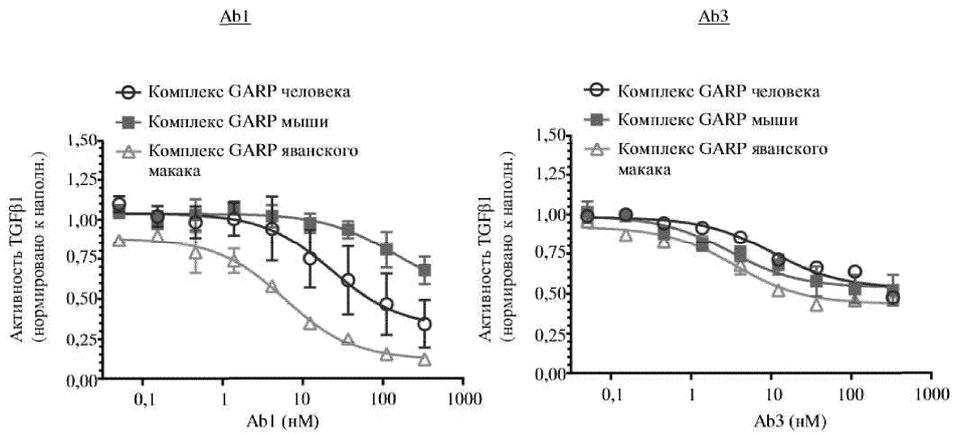
Фиг. 7B



Ингибирование комплекса GARP и LRRC33 посредством Ab2 представлено на фиг. 7A и 7B.

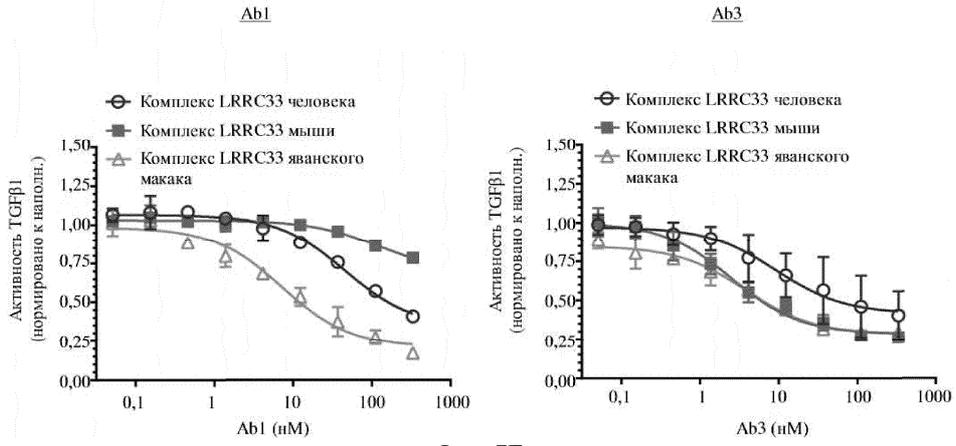
Фиг. 7C

Ингибирование активации GARP-проTGFβ1 (анализ SW480b6)

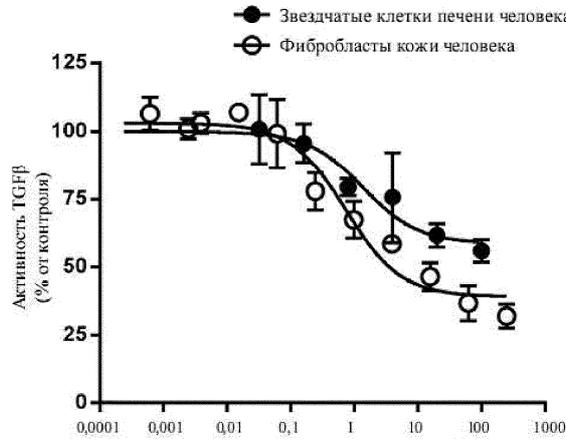


Фиг. 7D

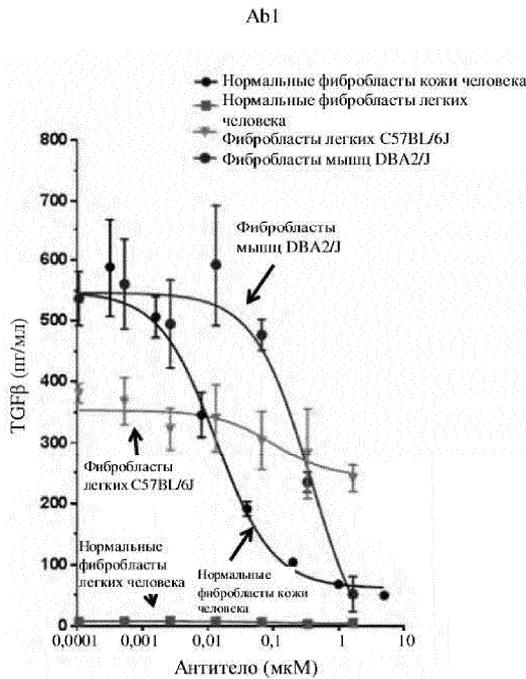
Ингибирование активации LRRС33-проТGFβ1 (анализ SW480b6)



Фиг. 7Е

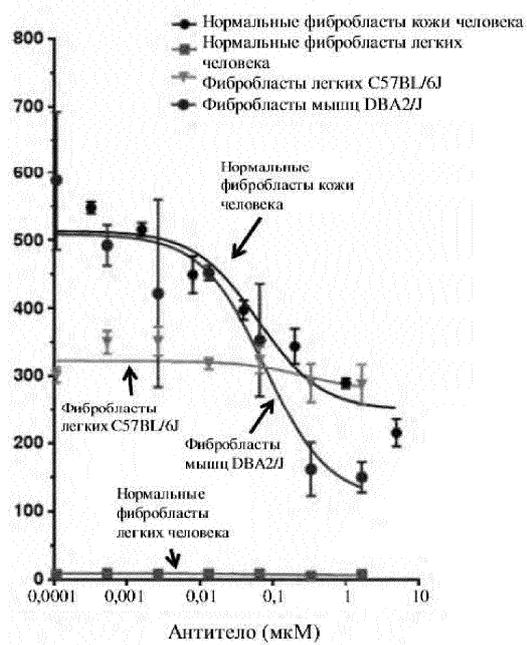


Фиг. 7F



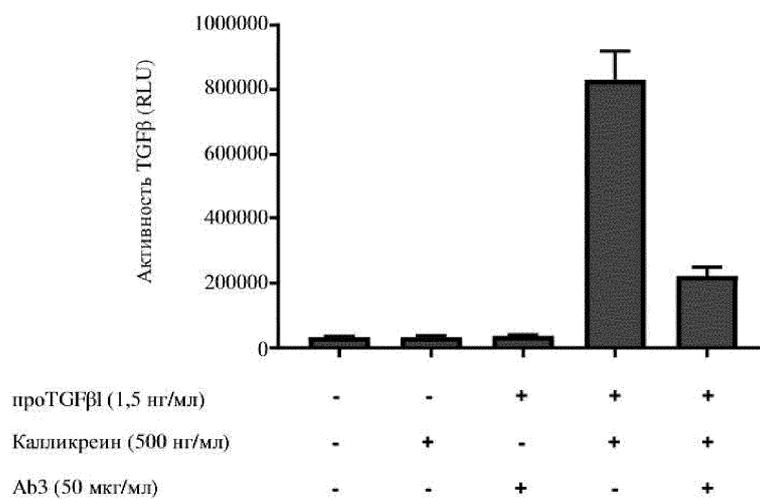
Фиг. 7G

Ab2

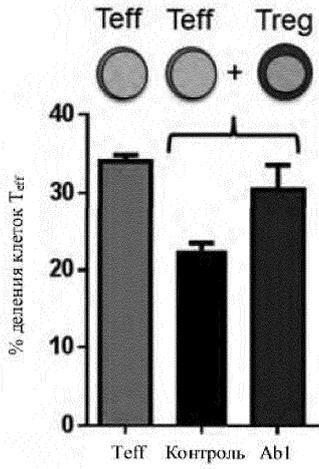


Фиг. 7H

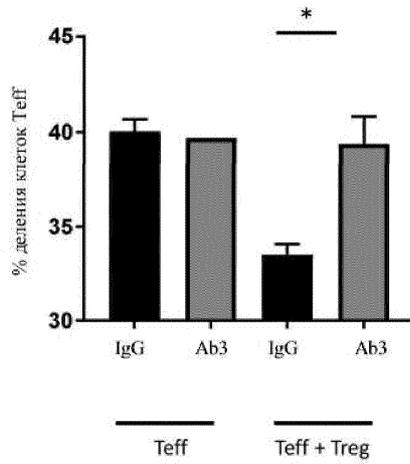
Ингибирование зависимой от протеазы активации TGFβ1



Фиг. 8



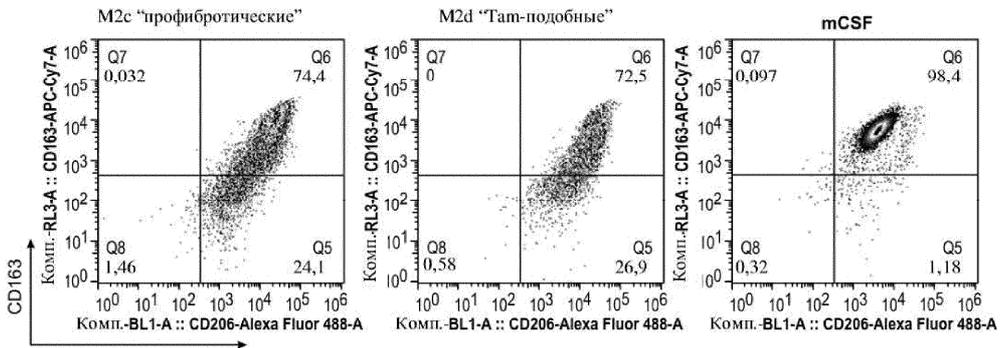
Фиг. 9А



\* P<0,05 (двусторонний Т-критерий)

Фиг. 9В

Макрофаги mCSF являются однородно "M2"



РВМС от здоровых доноров

CD14+ иммуномагнитное разделение = моноциты

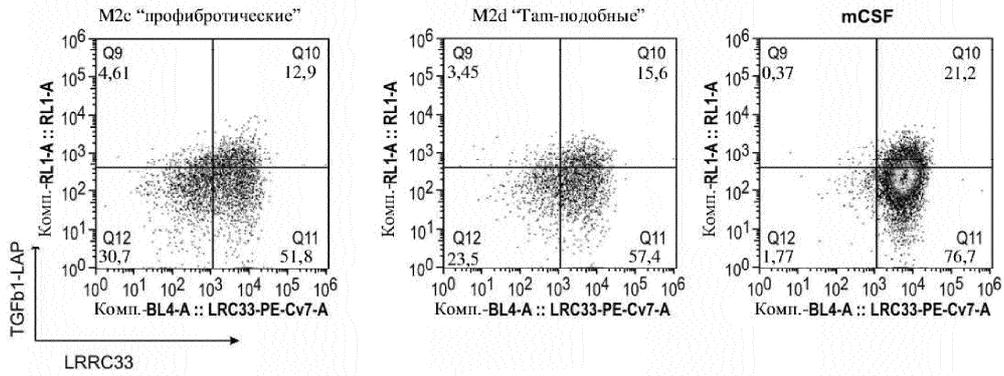
-1 неделя культивирования с 10% сывороткой человека + GMCSF или MCSF

Для индукции разных M2 макрофагов: 2-3 дня дополнительного культивирования с: M2c: IL10&TGFb, M2d: IL6

CD163 - сквенджер-рецептор гемоглобина  
CD206 - рецептор маннозы

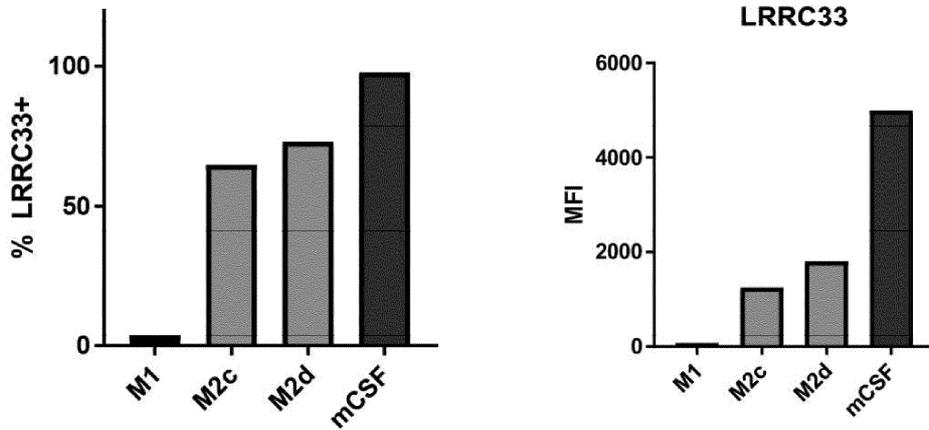
Фиг. 10А

Макрофаги mCSF однородно экспрессируют LRRC33

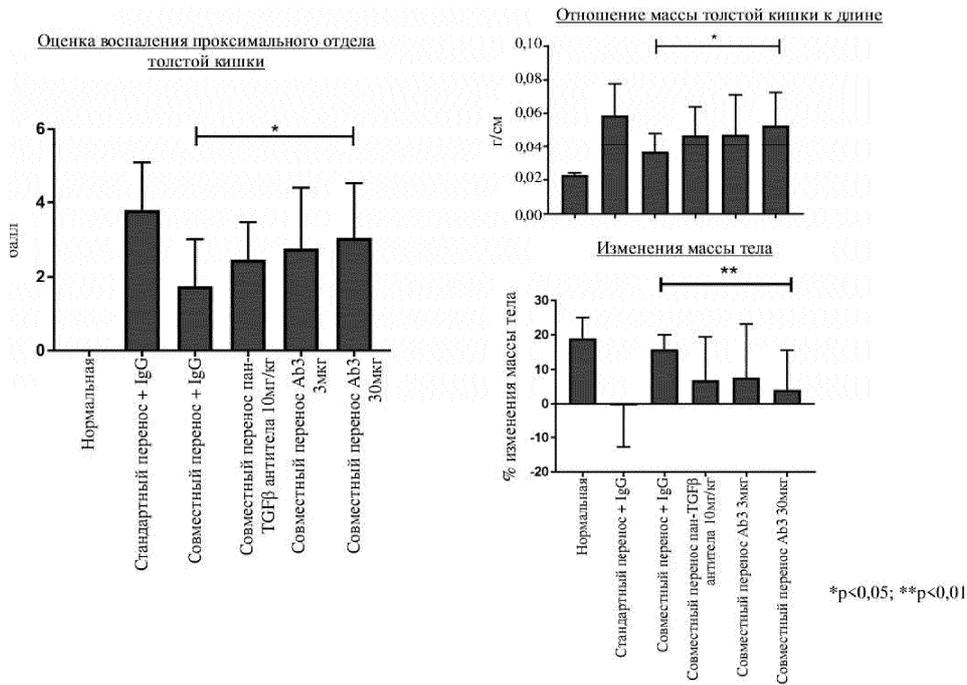


Фиг. 10В

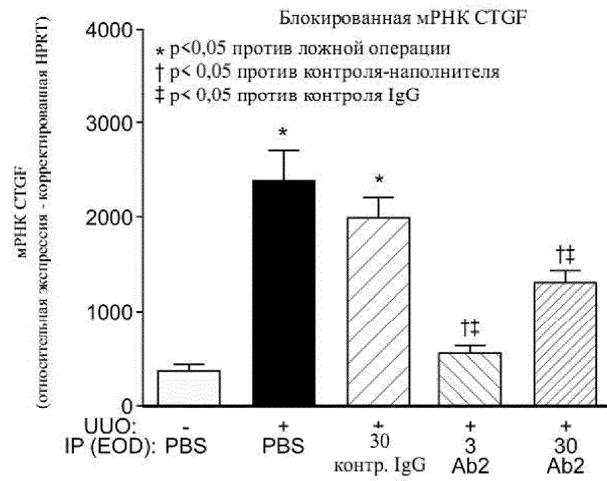
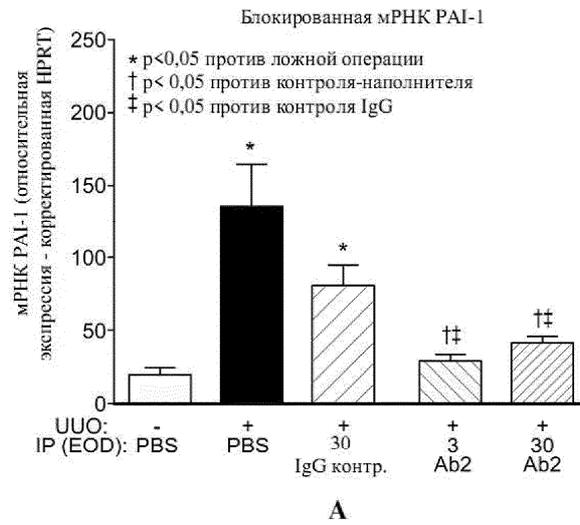
Экспрессия устойчивых LRRC33 на макрофагах MCSF



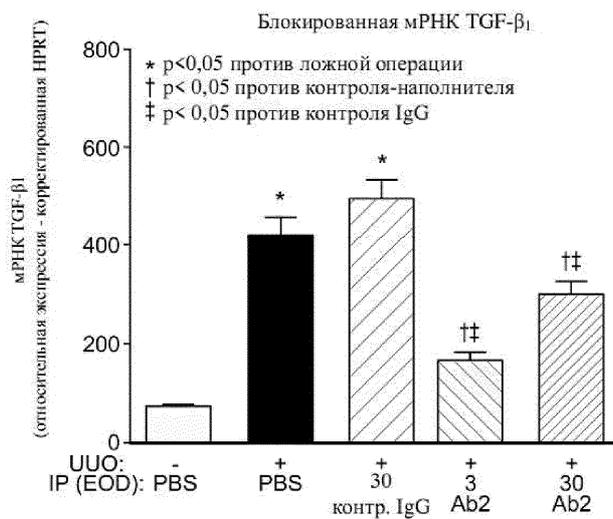
Фиг. 10С



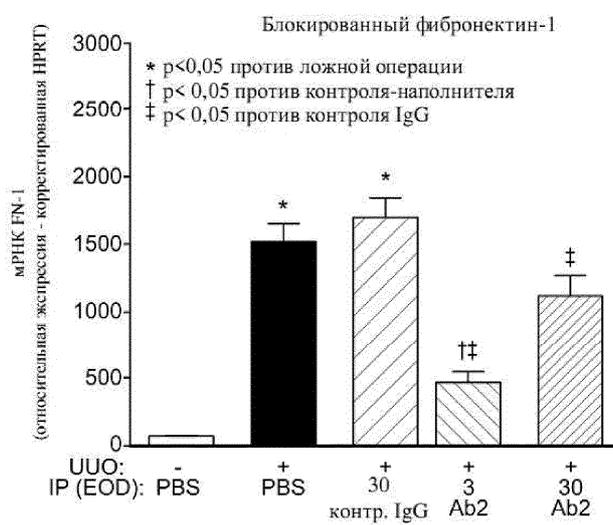
Фиг. 11



Фиг. 12А, В

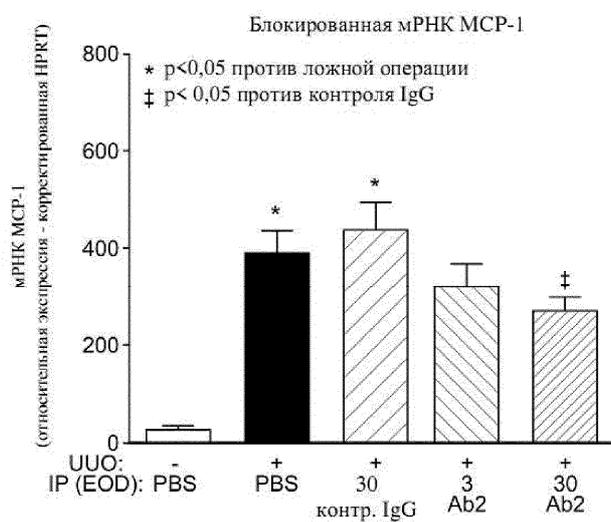
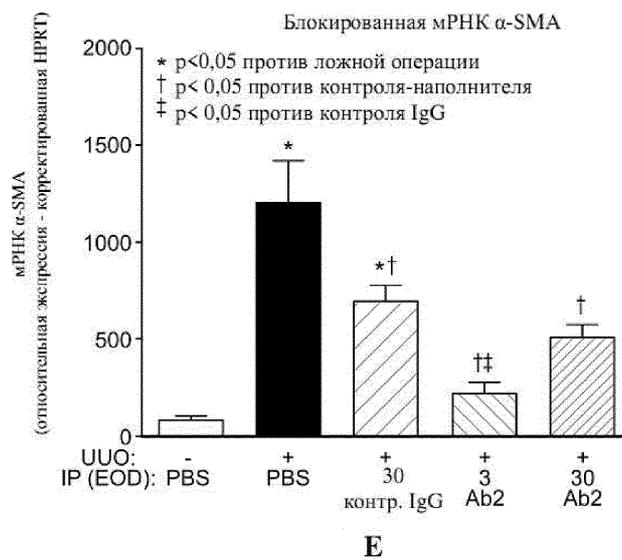


C

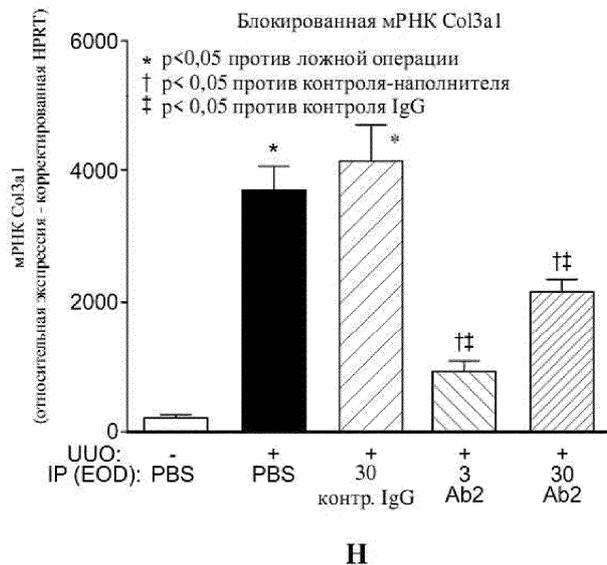
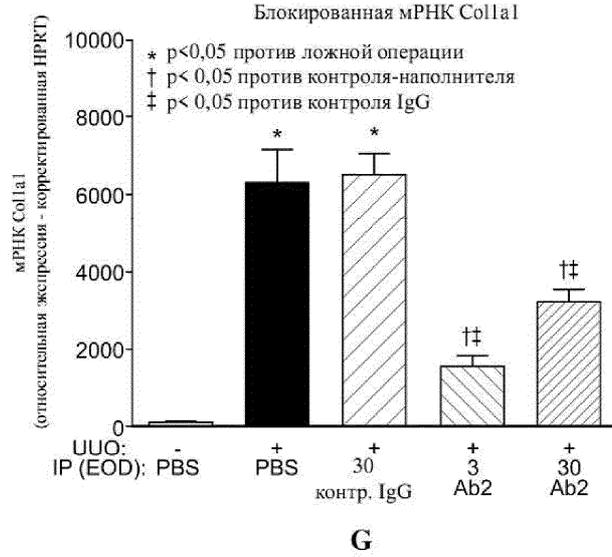


D

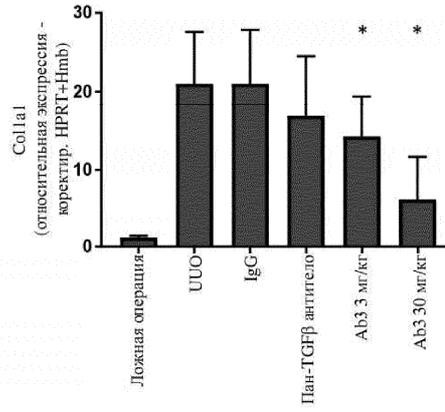
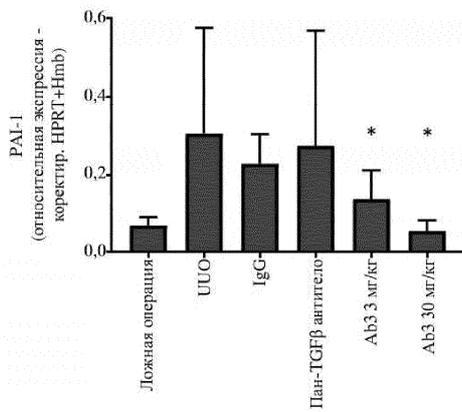
Фиг. 12C, D



Фиг. 12E, F

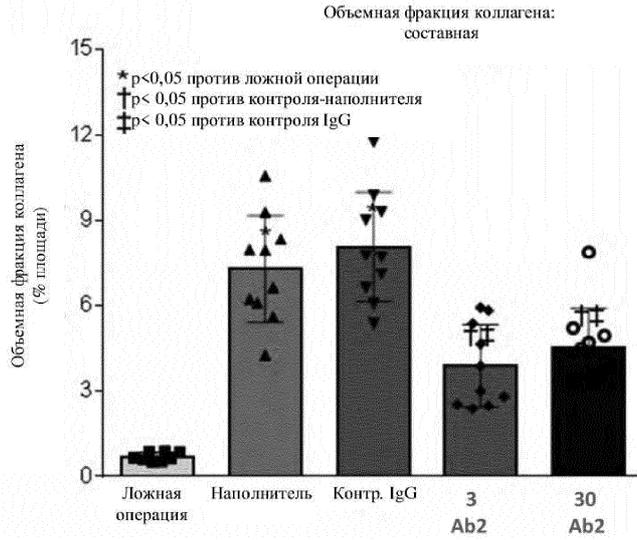


Фиг. 12G, H

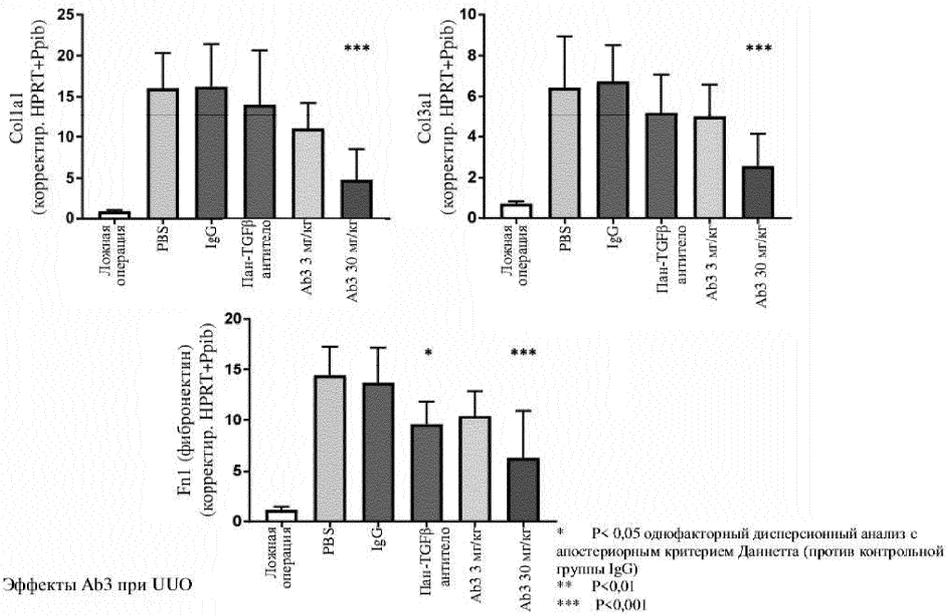


\* P < 0,05; двусторонний T-критерий против IgG

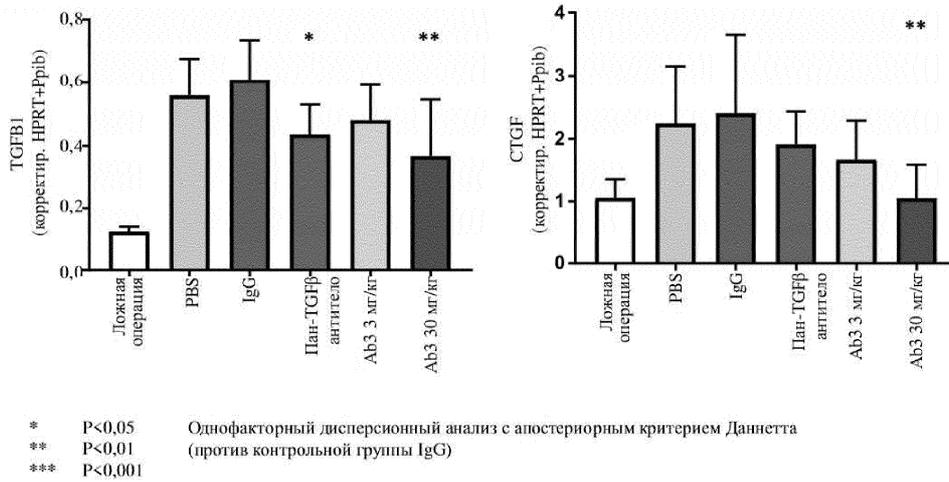
Фиг. 12I-J



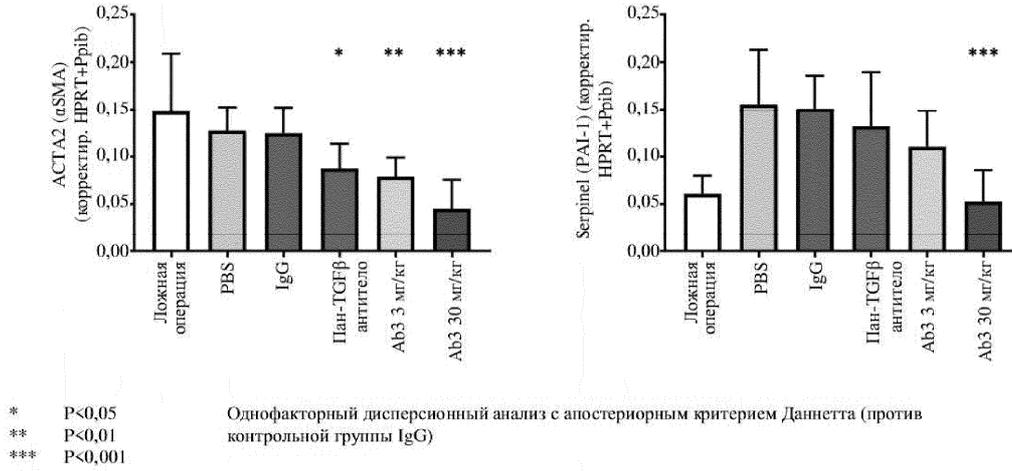
Фиг. 12К



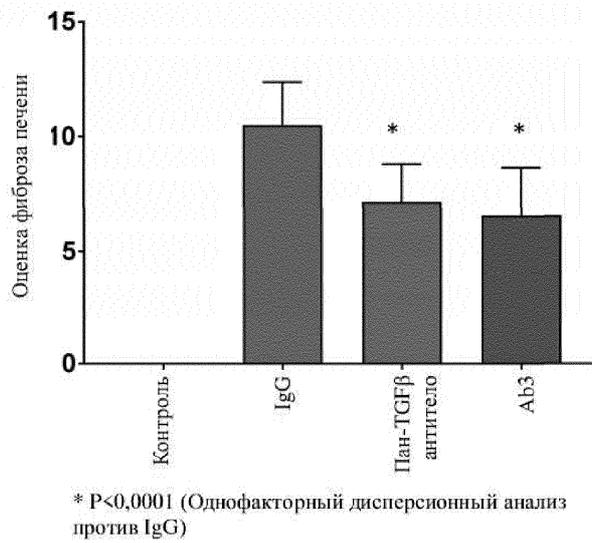
Фиг. 13А



Фиг. 13В

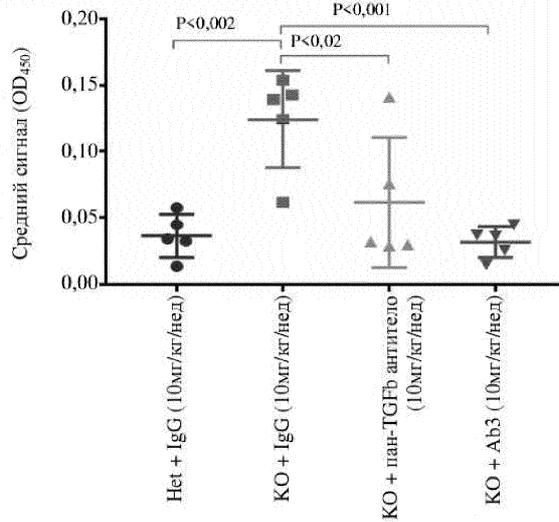


Фиг. 13С

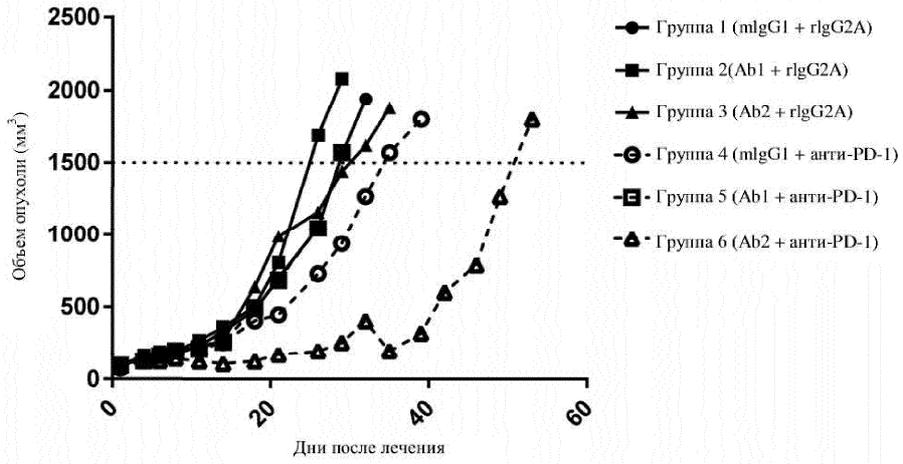


Фиг. 14

Связывание с мишенью в исследовании синдрома Альпорта отношение pSmad2/3:Smad2/3

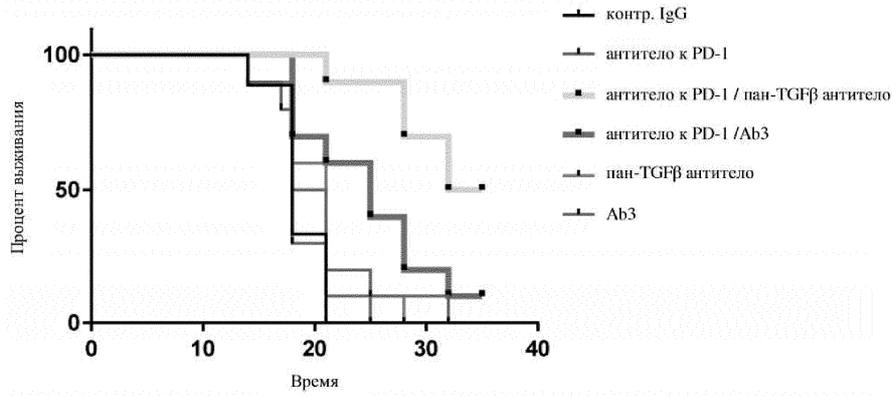


Фиг. 15

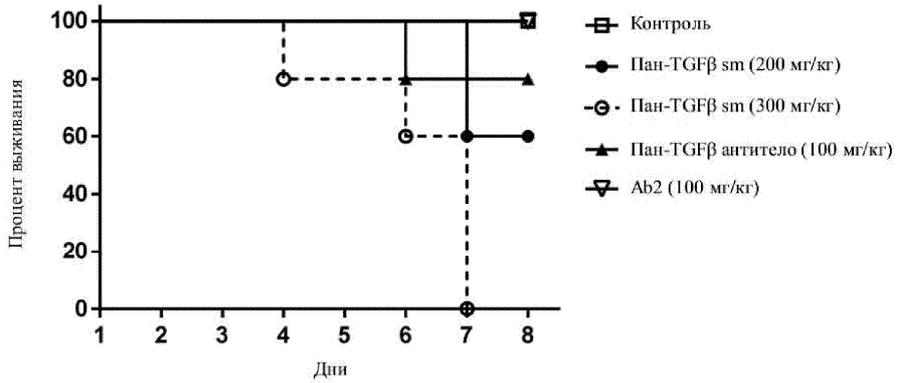


Фиг. 16

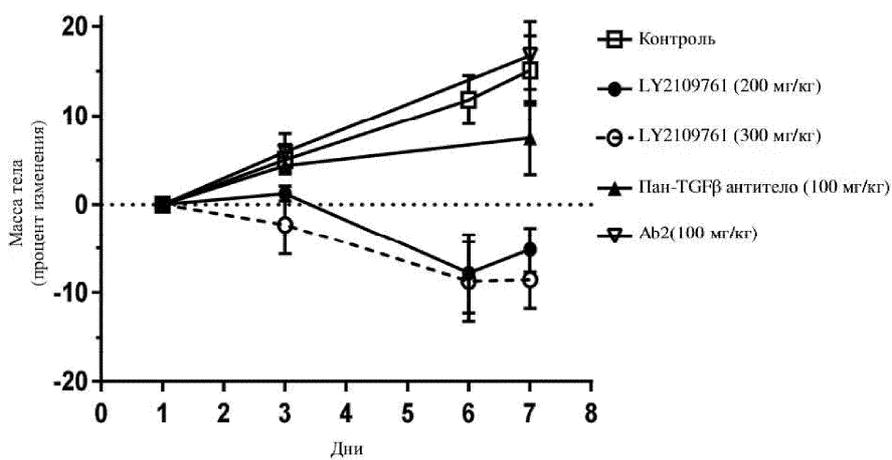
Эффекты Ab3 на вызвание в мышечной модели опухоли EMT6



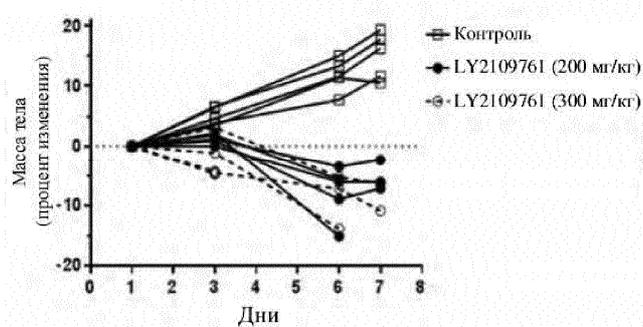
Фиг. 17



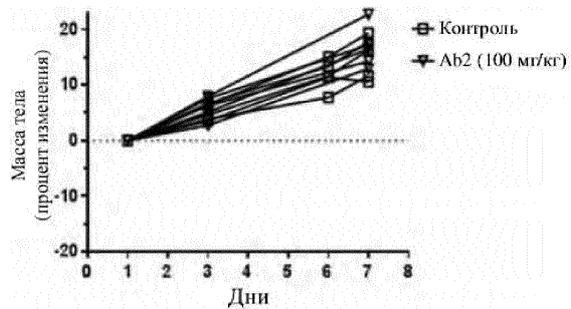
Фиг. 18А



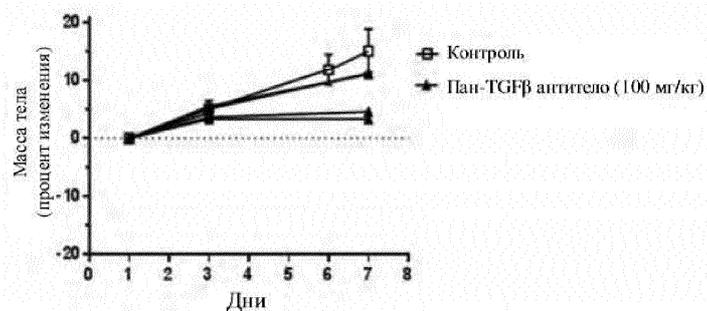
Фиг. 18В



Фиг. 18С

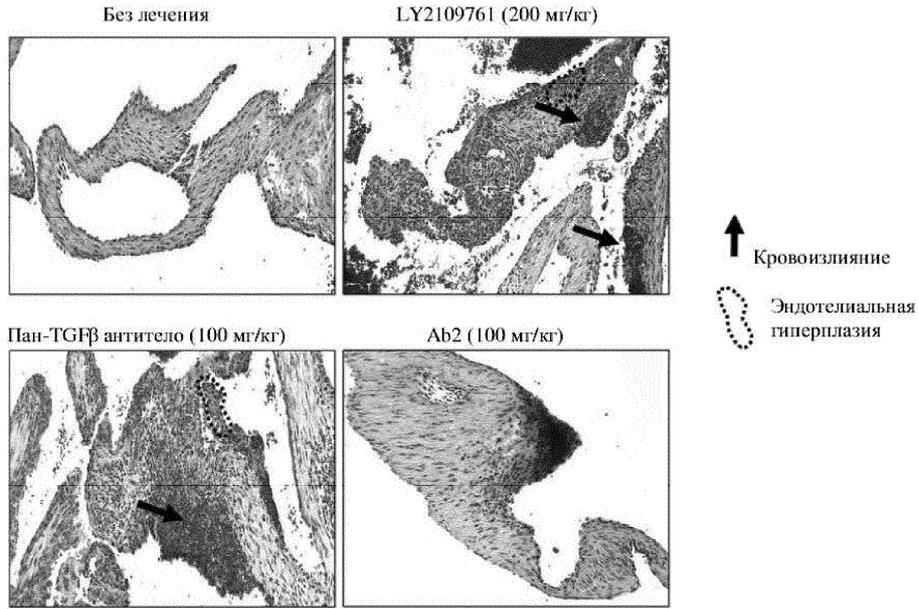


Фиг. 18D

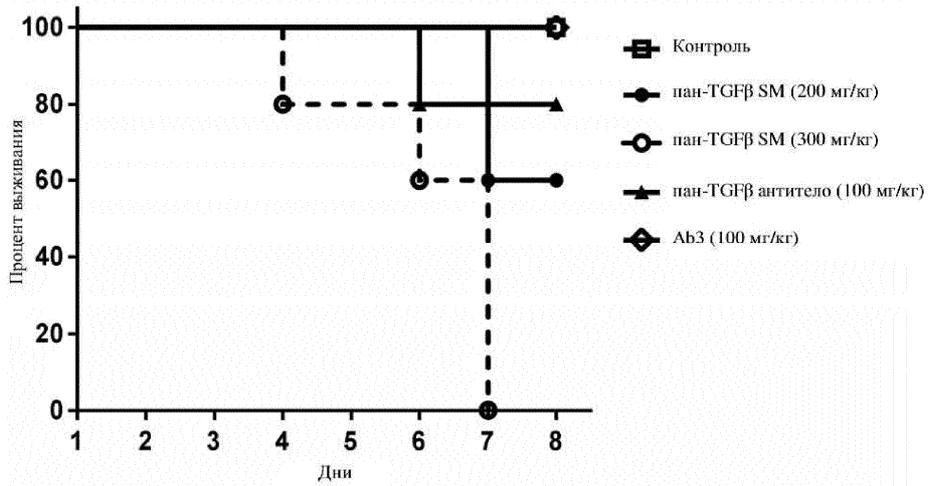


Фиг. 18Е

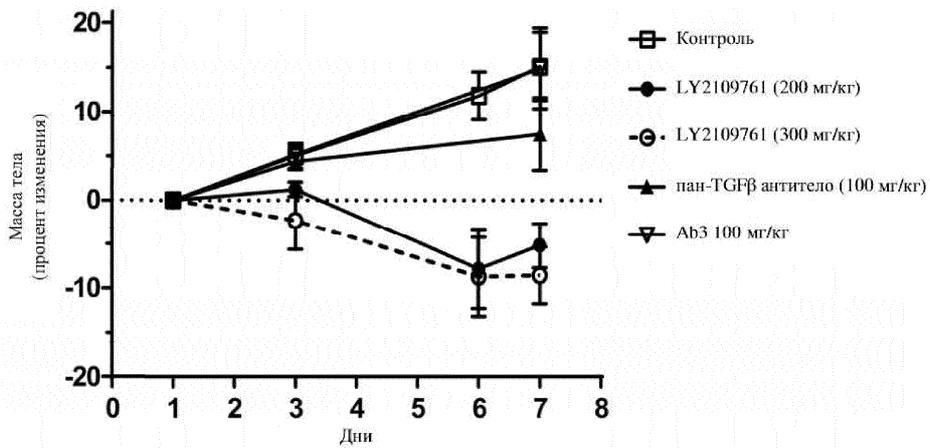
Сердечный клапан (вальвулопатия)



Фиг. 18F

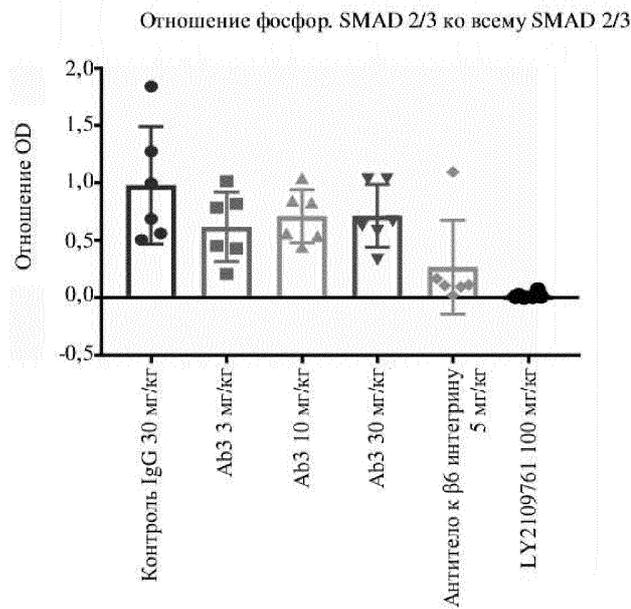


Фиг. 19А



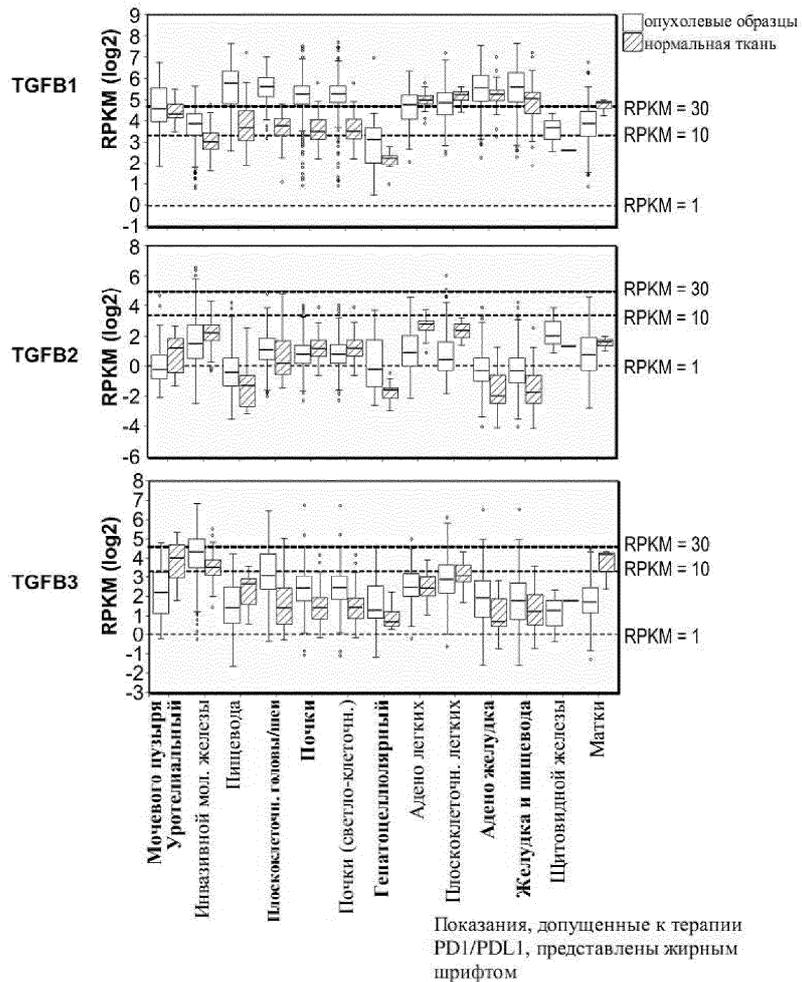
Фиг. 19В

Тоническая передача сигнала TGFβ в гомеостатических клетках BAL крыс



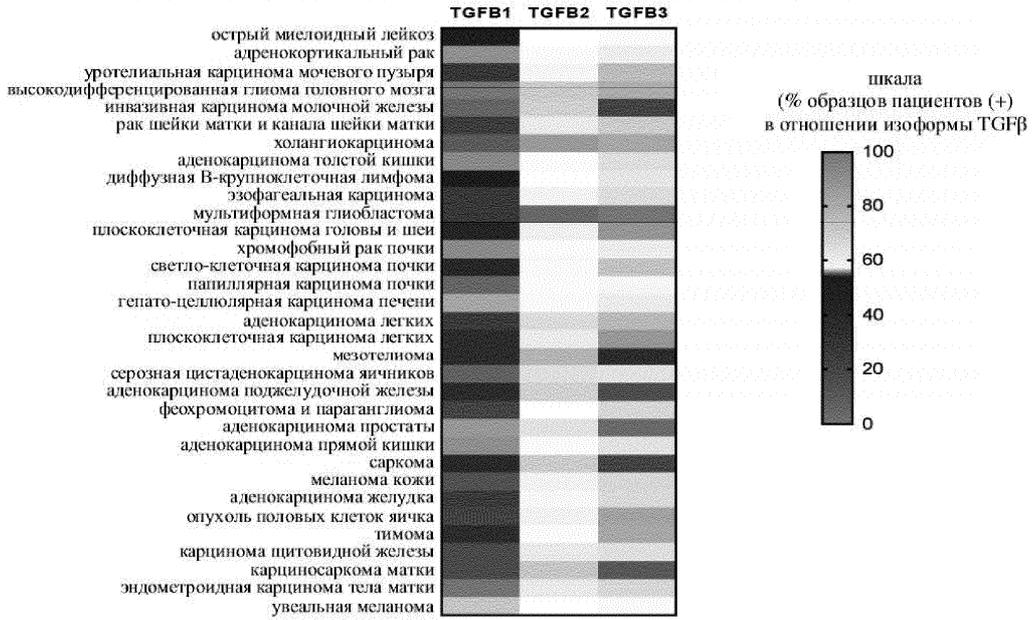
Фиг. 20

Экспрессия изоформы TGFβ по сравнению с компаратором-нормой (по типу рака)



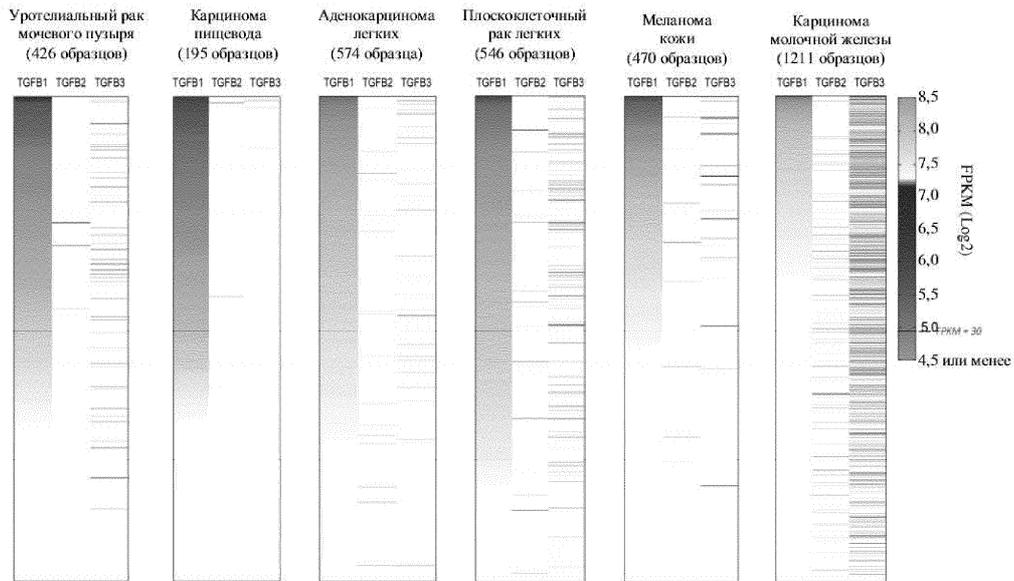
Фиг. 21A

Процент опухолей, экспрессирующих изоформы TGFβ, по типу рака



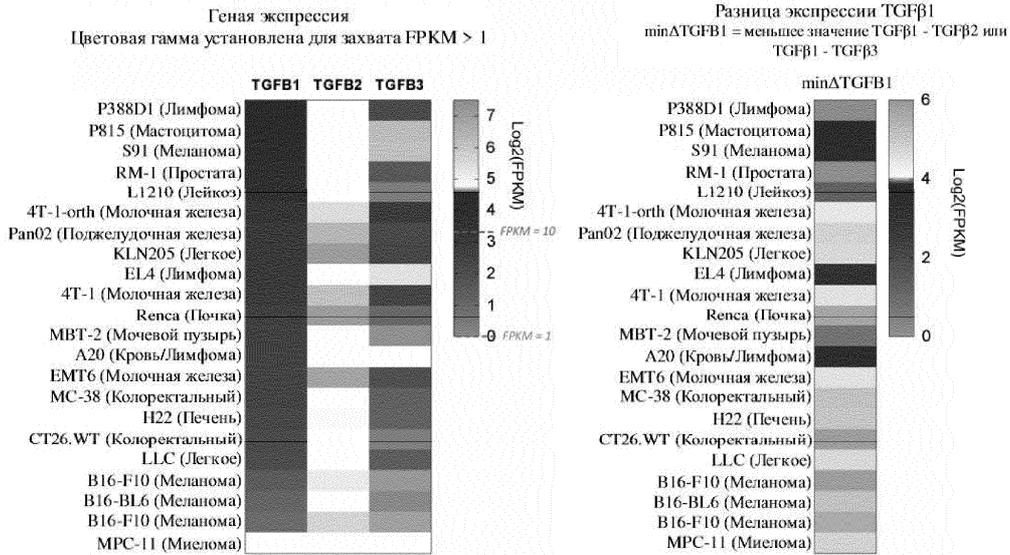
Фиг. 21В

Экспрессия изоформ TGFβ в образцах опухолей индивидуумов, по типу рака



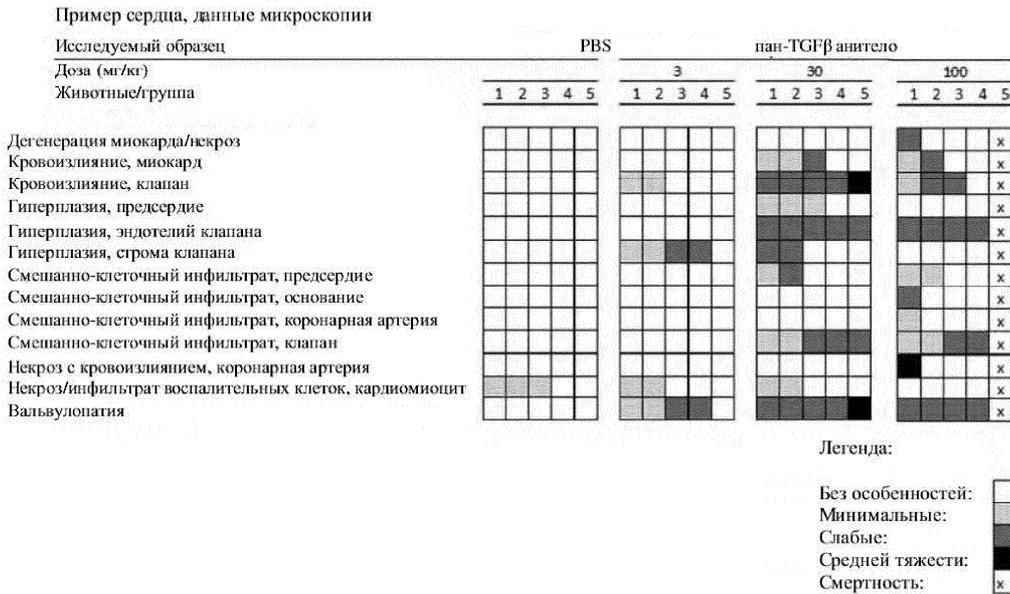
Фиг. 21С

Экспрессия изоформ TGFβ в мышиных клеточных линиях модели сингенного рака



Фиг. 21D

Данные антител пан-TGFβ из 1-недельного исследования безопасности



Фиг. 22

