(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292041 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.20

(22) Дата подачи заявки
2021.01.11

(51) Int. Cl. ***A61P 1/16*** (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) ИНГИБИТОРЫ TGFβ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/959,925; 63/033,904; 63/038,413**
(32) **2020.01.11; 2020.06.03; 2020.06.12**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/012930**
(87) **WO 2021/142427 2021.07.15**

(71) Заявитель:
СКОЛАР РОК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ваверсик Стефан, Шурпф Томас, Чапрон Кристофер, Кумар Сандип, Фоджел Адам (US)

(74) Представитель:
Костюшенкова М.Ю., Христофоров А.А., Угрюмов В.М., Прищепный С.В., Гизатуллина Е.М., Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф., Джермакян Р.В. (RU)

(57) В изобретении раскрыты новые ингибиторы активации TGFβ1 с продолжительным ингибирующим действием. Также предусмотрены способы, направленные на выбор подходящего ингибитора TGFβ для различных болезненных состояний и популяций пациентов.

202292041 A1

202292041 A1

ИНГИБИТОРЫ TGFβ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОПИСАНИЕ

Ссылка на родственные заявки

[1] В соответствии с § 119(e) раздела 35 Кодекса США (35 U.S.C.) согласно настоящей международной заявке испрашивается приоритет в соответствии со следующими заявками: предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/959925, поданной 11 января 2020 г., предварительной заявкой на выдачу патента США № 63/033904, поданной 3 июня 2020 г. и предварительной заявкой на выдачу патента США № 63/038413, поданной 12 июня 2020 г., содержание каждой из которых явным образом включено в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

Перечень последовательностей

[2] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки во всей полноте. Упомянутая копия в формате ASCII, созданная 6 января 2021 г., называется 127036-03920_SL.txt и имеет размер 209944 байта.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[3] Трансформирующий фактор роста бета-1 (TGFβ1) является членом суперсемейства факторов роста TGFβ наряду с двумя другими структурно родственными изоформами, а именно TGFβ2 и TGFβ3, каждая из которых кодируется отдельным геном. TGFβ функционируют как плейотропные цитокины, которые регулируют клеточную пролиферацию, дифференцировку, иммуномодуляцию (например, адаптивный иммунный ответ) и другие разнообразные биологические процессы как в гомеостазе, так и в контекстах заболеваний. Три изоформы TGFβ передают сигнал через одни и те же рецепторы клеточной поверхности и запускают сходные канонические события нисходящей передачи сигнала, которые включают путь SMAD2/3.

[4] TGFβ участвует в патогенезе и прогрессировании ряда болезненных состояний, таких как фиброз, рак и иммунные нарушения. Во многих случаях такие состояния связаны с дисрегуляцией внеклеточного матрикса (ECM). По этим и другим причинам TGFβ является привлекательной терапевтической мишенью для лечения фиброзных состояний, а также различных пролиферативных нарушений, таких как рак. Однако наблюдения доклинических исследований, в том числе на крысах и собаках, выявили серьезную

токсичность, связанную с противодействием TGFβ-сигнализации *in vivo*, и на сегодняшний день на рынке нет доступных терапевтических средств TGFβ, которые считаются как безопасными, так и эффективными.

[5] Ранее заявитель описал класс моноклональных антител, которые функционируют в соответствии с новым механизмом действия, модулируя сигнализацию факторов роста (смотри, например, WO 2014/182676). Эти антитела были разработаны так, чтобы использовать тот факт, что TGFβ1 экспрессируется в виде латентного пробелкового комплекса, состоящего из продомена и фактора роста, которому необходима стадия активации, на которой фактор роста высвобождается из латентного комплекса. Вместо того, чтобы использовать традиционный подход прямого нацеливания на сам растворимый фактор роста после активации (например, нейтрализующие антитела), новый класс ингибирующих антител специфически нацеливается на сам неактивный пропробелковый комплекс, чтобы упреждающе блокировать стадию активации до лиганд-рецепторного взаимодействия. Без ограничения теорией этот уникальный механизм действия может способствовать получению как пространственных, так и временных преимуществ, поскольку они воздействуют на источник, то есть путем нацеливания на латентный комплекс proTGFβ1 в микроокружении заболевания, до того как произойдет активация. Действительно, недавнее исследование дополнительно подтверждает преимущества локального нацеливания на связанный с тканью/клеткой комплекс в источнике, а не на растворимые активные молекулы (то есть зрелые факторы роста после высвобождения из источника). Ishihara *et al.*, (*Sci. Transl. Med.* 11, eaau3259 (2019) “Targeted antibody and cytokine cancer immunotherapies through collagen affinity”) сообщили, что при системном введении лекарственные средства нацеливаются на пораженную ткань путем конъюгации с коллаген-связывающим фрагментом, и они смогли повысить противоопухолевый иммунитет и снизить связанную с лечением токсичность по сравнению с ненацеленными аналогами.

[6] Соответственно, были созданы моноклональные антитела, которые специфически связываются и ингибируют стадию активации TGFβ1 (то есть высвобождение зрелого фактора роста из латентного комплекса) (так называемые «ингибиторы активации») изоформно-селективным образом; они раскрыты, например, в документах WO 2017/156500, WO 2018/129329, PCT/US2019/041373 и PCT/US2019/041390, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте. Эти изоформно-специфичные ингибирующие средства продемонстрировали как эффективность, так и безопасность *in vivo*.

[7] В то время как более ранняя работа, описанная выше, продемонстрировала полезность антител, способных связывать каждый из известных комплексов proTGFβ1-презентирующая молекула, и ингибирующее действие как *in vitro*, так и *in vivo*, авторы настоящей заявки приступили к созданию улучшенных ингибиторов активации TGFβ1, характеризующихся повышенной аффинностью, активностью, продолжительностью действия и терапевтической эффективностью.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

[8] В настоящем документе раскрыты изоформно-селективные ингибиторы активации TGFβ1 с полезными свойствами. Более конкретно, к ингибиторам TGFβ1 относятся моноклональные антитела (включая иммуноглобулины и их антигенсвязывающие фрагменты или части), которые демонстрируют низкую скорость диссоциации (то есть скорость распада, k_{OFF}). Таким образом, настоящее изобретение основано по меньшей мере на признании того, что для лечения хронического и прогрессирующего заболевания, такого как фиброз, могут потребоваться ингибиторы с большой продолжительностью действия, на которой может отражаться скорость диссоциации такого антитела.

[9] Аффинность антитела к его антигену обычно измеряется как равновесная константа диссоциации или K_D. Отношение экспериментально измеренных скоростей распада и образования (k_{OFF}/k_{ON}) можно использовать для расчета значения K_D. Значение k_{OFF} представляет собой скорость диссоциации антитела, которая указывает на то, как быстро оно диссоциирует от своего связанного антигена, в то время как значение k_{ON} представляет собой скорость ассоциации антитела, которая показывает, насколько быстро оно связывается со своим антигеном. Последняя обычно зависит от концентрации, тогда как первая не зависит от концентрации. Значение K_D относится к концентрации антитела (количеству антитела, необходимому для конкретного эксперимента), и поэтому чем ниже значение K_D (ниже концентрация), тем выше аффинность антитела. По отношению к эталонному антителу антитело с более высокой аффинностью может характеризоваться более низкой скоростью k_{OFF}, более высокой скоростью k_{ON} или и тем, и другим.

[10] Обе скорости k_{OFF} и k_{ON} вносят вклад в общую аффинность конкретного антитела к своему антигену, и относительная важность или влияние каждого компонента могут зависеть от механизма действия антитела. Например, нейтрализующие антитела, которые связывают зрелые факторы роста (например, растворимый недолговечный лиганд TGFβ1, высвобождаемый из латентного комплекса), должны конкурировать с эндогенными высокоаффинными рецепторами за связывание лиганда *in vivo*. Поскольку взаимодействие

лиганд-рецептор является локальным событием, и поскольку лиганд является короткоживущим, такие антитела должны быть способны к быстрому нацеливанию и связыванию растворимого фактора роста до того, как лиганд найдет свой клеточный рецептор в ткани, тем самым активируя сигнальный путь TGFβ1. Поэтому, для того чтобы нейтрализующие антитела, нацеленные на лиганд, были активны, особенно важной может быть способность быстро связывать целевой фактор роста, то есть *высокая скорость ассоциации* (k_{ON}).

[11] С другой стороны, заявитель предположил, что антитела, которые ингибируют сигнализацию TGFβ1, предотвращая высвобождение зрелого фактора роста из латентного комплекса («ингибиторы активации»), могут, предпочтительно, получать преимущество от *низкой скорости диссоциации*, когда антитело связано с антигеном-мишенью (например, комплексами proTGFβ1). В отличие от нейтрализующих антител такие антитела не конкурируют напрямую с клеточными рецепторами; вместо этого они работают еще до сигнализации путем нацеливания на неактивные формы-предшественники (например, латентные комплексы proTGFβ1), которые остаются в состоянии покоя в тканевой среде, тем самым превентивно предотвращая активацию TGFβ1. Такие антитела могут проявлять свое ингибирующее действие путем предотвращения высвобождения зрелого фактора роста из латентного комплекса. Например, такие антитела могут функционировать как «зажим», запирая активный фактор роста в структуре каркаса продомена для сохранения его в неактивном (например, «латентном») состоянии. Действительно, структурный анализ, включая картирование эпитопов, дал представление о молекулярном механизме, лежащий в основе способности этих антител блокировать активацию TGFβ1. В этом отношении особенно полезной целью может быть область лассо латентности продомена.

[12] Ожидается, что при соединении с мишенью антитела, которые способны оставаться связанными с мишенью (например, очень медленно диссоциировать от латентного комплекса), будут иметь преимущество, заключающееся в достижении превосходной активности *in vivo*, благодаря повышенной продолжительности эффекта и/или авидности. Основываясь на таком понимании, заявитель настоящего изобретения стремился идентифицировать изоформно-селективные ингибиторы активации TGFβ1 с особенно низкими значениями k_{OFF} по сравнению с ранее описанными антителами. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением предпочтительные антитела характеризуются высокой аффинностью (например, K_D в диапазоне от субнаномолярноых до пикомолярных значений), в первую очередь обусловленной низкой скоростью диссоциации (k_{OFF}) в противоположность высокой скорости ассоциации (k_{ON}). Согласно

некоторым вариантам осуществления такие антитела связывают эпитоп, который содержит по меньшей мере часть лассо латентности.

[13] Соответственно, настоящее изобретение относится к изоформно-селективному ингибитору активации TGFβ1, причем данный ингибитор представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые селективно ингибируют активацию TGFβ1; причем данное моноклональное антитело связывает человеческий LTBP1-proTGFβ1 и/или человеческий LTBP3-proTGFβ1 со скоростью одновалентной диссоциации 10,0e-04 или менее, измеренной с помощью способа на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR), и, необязательно, со значением K_D<1,0 нМ; и причем данное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат следующие шесть CDR: H-CDR1, содержащий GFTFADYA (SEQ ID NO: 276); H-CDR2, содержащий ISGSG(X_1)AT, где, необязательно, X_1 представляет собой A или K (SEQ ID NO: 277); H-CDR3, содержащий VSSG(X_1)WD(X_2)D, где, необязательно, X_1 представляет собой H, D или Q; и где, также необязательно, X_2 представляет собой F или Y (SEQ ID NO: 278); L-CDR1, содержащий QSISSY (SEQ ID NO: 279); L-CDR2, содержащий AAS(X_1)(X_2)(X_3)(X_4), где, необязательно, X_1 представляет собой N, G или V; где, также необязательно, X_2 представляет собой L, N или E; где, также необязательно, X_3 представляет собой Q или E; и где, также необязательно, X_4 представляет собой S или T (SEQ ID NO: 280); и L-CDR3, содержащий QQTY(X_1)VPLT, где, необязательно, X_1 представляет собой T или G (SEQ ID NO: 281).

[14] Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело содержит H-CDR1, содержащий GFTFADYA (SEQ ID NO: 276); H-CDR2, содержащий ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282); H-CDR3, содержащий VSSG(X_1)WD(X_2)D, где, необязательно, X_1=H или Q и, также необязательно, X_2=Y или F (SEQ ID NO: 283); L-CDR1, содержащий QSISSY (SEQ ID NO: 279); L-CDR2, содержащий AASGLES (SEQ ID NO: 284); и L-CDR3, содержащий QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

[15] Согласно особенно предпочтительным вариантам осуществления антитело содержит шесть последовательностей CDR Ab42, Ab46 или Ab50.

[16] Настоящее изобретение относится к композициям, таким как фармацевтические композиции (например, составы, лекарственный препарат), подходящим для введения пациентам-людям, содержащие по меньшей мере одно из антител или их фрагментов согласно настоящему изобретению, и вспомогательное средство. Таким образом, антитела или их фрагмент согласно настоящему изобретению можно применять в производстве такого лекарственного препарата.

[17] Настоящее изобретение также относится к терапевтическому применению таких антител. Таким образом, TGFβ1-селективные ингибиторы (например, моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты) согласно настоящему изобретению можно применять в лечении связанных с TGFβ1 показаний у субъекта. TGFβ1-селективные ингибиторы могут быть особенно полезны для лечения таких заболеваний или нарушений, связанных с дисрегуляцией внеклеточного матрикса (ECM), включая, например, фиброзные нарушения (такие как фиброз органов, и фиброз, связанный с хроническим воспалением), пролиферативные нарушения (такие как рак, например солидные опухоли и миелофиброз), заболевание, связанное с эндотелиально-мезенхимальным переходом (EndMT), заболевание, связанное с эпителиально-мезенхимальным переходом (EMT), заболевание, связанное с протеазами, заболевание с аберрантной экспрессией генов определенных маркеров, описанных в настоящем документе. TGFβ1-селективные ингибиторы можно применять в сочетании с другой терапией в виде комбинированной терапии (например, дополнительной терапии). Настоящее изобретение относится к способам лечения такого заболевания или нарушений, предусматривающим введение TGFβ1-селективного ингибитора субъекту в виде или монотерапии, или комбинированной терапии.

[18] Настоящее изобретение относится к отбору субъектов или пациентов, которые, вероятно, ответят на терапию ингибированием TGFβ1 или получат от нее пользу. В настоящий документ включены связанные способы диагностики, а также способы мониторинга или определения терапевтического ответа на терапию ингибированием TGFβ1.

[19] Настоящее изобретение относится к процессам и способам идентификации или выбора TGFβ1-селективных ингибиторов, подходящих для терапевтического применения. Согласно предпочтительным вариантам осуществления выбор включает одно или несколько антител или антигенсвязывающих фрагментов с особенно предпочтительными кинетическими критериями, характеризующихся: i) субнаномолярной аффинностью к каждому из комплексов человеческий LTBP1/3-proTGFβ1 (например, K_D<1 нМ) и ii) низкой скоростью диссоциации (k_{OFF}), например ≤5,00E-4, измеренной с помощью подходящего анализа связывания/кинетики *in vitro*, например с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), например систем на основе BIACORE®. Отобранные антитело или несколько антител подвергают оценке в доклинических исследованиях, включающих исследование эффективности и токсикологическое исследование/исследование безопасности с использованием подходящих доклинических моделей. Эффективные количества антитела или антител, определенные в исследовании эффективности, ниже

уровня, который приводит к нежелательной токсичности, определенного в токсикологическом исследовании/исследовании безопасности. Предпочтительно, отбирают антитело или антитела, которые характеризуются по меньшей мере 3-кратным, 6-кратным и, более предпочтительно, 10-кратным терапевтическим окном. Эффективные количества антител согласно настоящему изобретению могут составлять от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг при еженедельном введении. Согласно предпочтительным вариантам осуществления максимально допустимая доза (MTD) антител согласно настоящему изобретению составляет >100 мг/кг при еженедельном введении в течение по меньшей мере 4 недель.

[20] Настоящее раскрытие включает неожиданное заключение, что, вопреки общему убеждению, что для антифибротического эффекта необходимо ингибирование нескольких изоформ, одновременное ингибирование TGFβ3 вызывает профибротический эффект у мышей. Это наблюдение повышает вероятность того, что неселективные ингибиторы TGFβ (такие как пан-ингибиторы и ингибиторы TGFβ1/3) могут фактически усугублять фиброз. Преимущественно, раскрытые в настоящем документе антитела изоформно-селективны в том смысле, что они специфически взаимодействуют с латентным комплексом TGFβ1 и делают это с низкой скоростью диссоциации. Таким образом, настоящее изобретение включает понимание того, что при выборе конкретного ингибитора TGFβ для пациентов с фиброзным состоянием (например, заболеванием, связанным с дисрегуляцией ECM, таким как сердечно-сосудистые заболевания), следует тщательно учитывать изоформную селективность, чтобы избежать риска усугубления дисрегуляции ECM. Соответственно, настоящее раскрытие включает терапевтические способы, предусматривающие выбор ингибитора TGFβ, который не ингибирует TGFβ3, для лечения субъекта с фиброзным состоянием, причем, необязательно, у субъекта есть фиброз органов или рак, причем, также необязательно, рак представляет собой миелофиброз. Согласно некоторым вариантам осуществления, у субъекта есть сердечно-сосудистое заболевание или риск его развития. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ является TGFβ1-селективным в том смысле, что он не ингибирует TGFβ2 и TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления фиброз органов представляет собой фиброз печени, фиброз почек или фиброз легких (например, IPF). Согласно некоторым вариантам осуществления фиброз печени связан с NASH. Пациенты с риском развития фиброза или состояния с дисрегуляцией ECM могут включать пациентов, страдающих метаболическими состояниями, такими как диабет, ожирение и NASH.

Краткое описание фигур

[21] На **фиг. 1** показаны репрезентативные кривые связывания OCTET®, показывающие ассоциацию и диссоциацию Ab2 с шестью различными антигенными комплексами. Ab2 специфически связывает малые латентные комплексы (SLC) TGFβ1, но не зрелые факторы роста, изоформно-селективным образом.

[22] На **фиг. 2** показаны репрезентативные кривые связывания Biacore, показывающие ассоциацию и диссоциацию Ab46 и эталонного антитела. Представлена сводка по кинетике связывания.

[23] На **фиг. 3** представлены 4 графика, которые показывают дозозависимое связывание по данным ELISA 5 антител (hIgG4) с указанными LLC.

[24] На **фиг. 4** представлены 4 графика, которые показывают дозозависимое связывание по данным ELISA 5 антител (hIgG4) с LLC.

[25] На **фиг. 5A** изображен график, показывающий влияние Ab2 или Ab3 на экспрессию генов коллагенов (Col1a1 и Col3a1) у мышей UUO. Мыши получали 3, 10 или 30 мг/кг в неделю Ab3 или 3 или 10 мг/кг в неделю Ab2. В качестве контроля использовали только IgG.

[26] На **фиг. 5B** изображен график, показывающий влияние Ab3 или Ab2 на экспрессию генов Fn1 и Loxl2 у мышей UUO. Мыши получали 3, 10 или 30 мг/кг в неделю Ab3 или 3 или 10 мг/кг в неделю Ab2. В качестве контроля использовали только IgG.

[27] На **фиг. 6** обобщена статистическая значимость изменений экспрессии генов (по сравнению с UUO + IgG) после лечения в модели UUO.

[28] На **фиг. 7A** и **фиг. 7B** изображены графики, показывающие относительное соотношение фосфорилированных и общих (фосфорилированных и нефосфорилированных) SMAD2/3 в почках из генетической модели синдрома Альпорта, получавших и не получавших антитела Ab2 и Ab3. На **фиг. 7C** изображен график, показывающий влияние Ab3 и Ab2 на экспрессию генов в почках из генетической модели синдрома Альпорта.

[29] На **фиг. 8A** изображен график, показывающий экспозицию Ab2 в сыворотке в модели на мышах на CDHFD через 6, 8, 10 и 12 недель.

[30] На **фиг. 8B** изображен график, показывающий влияние Ab2 на фосфорилирование SMAD2/3 в ткани печени получавших CDHFD мышей.

[31] На **фиг. 8C** изображен график, показывающий корреляцию между сниженным уровнем фосфорилированных SMAD2/3 и экспозицией Ab2.

[32] На **фиг. 8D** изображен график, показывающий сравнение влияния Ab3 и Ab2 на фосфорилирование SMAD2/3 в ткани печени получавших CDHFD мышей.

[33] На **фиг. 8E** изображен график, показывающий влияние Ab3 и Ab2 на фиброз печени, измеренный по уровням гидроксипролина.

[34] На **фиг. 8F** изображен график, показывающий влияние Ab2 на α-Col1 по IHC у получавших CDHFD мышей.

[35] На **фиг. 8G** изображен график, показывающий корреляцию между экспозицией Ab2 и снижением уровня α-Col1.

[36] На **фиг. 9** изображен график, показывающий влияние Ab3 и Ab2 на окрашивание пикросириусом красным (PRS) в модели фиброза печени, вызванного CCL4, на мышах.

[37] На **фиг. 10A** представлена тепловая карта HDX-MS для комплекса Fab Ab3-LTBP3:ProTGFβ1. Фиг. 10A раскрывает SEQ ID NO: 25.

[38] На **фиг. 10B** показаны защищенные Ab3 участки на поверхностной и ленточной диаграмме структуры proTGFβ1. Фиг. 10B раскрывает SEQ ID NO: 258-260 и 304-309, соответственно, в порядке появления.

[39] На **фиг. 10C** представлена тепловая карта HDX-MS для комплекса Fab Ab2-proTGFβ1 C4S. Фиг . 10C раскрывает SEQ ID NO: 25.

[40] На **фиг. 10D** показаны защищенные Ab2 участки на поверхностной и ленточной диаграмме структуры proTGFβ1. Область 1 перекрывается с так называемым «лассо латентности» в продомене proTGFβ1, тогда как область 3 находится в домене фактора роста. Также представлено выравнивание последовательностей между тремя изоформами. Фиг. 10D раскрывает SEQ ID NO: 261, 259, 262, 310, 305, 311-312, 308 и 313, соответственно, в порядке появления.

[41] На **фиг. 11** представлена кристаллическая структура Fab Ab2, связанного с proTGFβ1, и показаны контактирующие остатки на proTGFβ1 и Ab2. Фиг. 11 раскрывает SEQ ID NO: 314-316, соответственно, в порядке появления.

[42] На **фиг. 12A** показаны результаты микроскопии сердца по антителу к пан-TGFβ из 1-недельного токсикологического исследования на крысах.

[43] На **фиг. 12B** показаны результаты микроскопии сердца по Ab3 по сравнению с ингибитором ALK5 или антителом к пан-TGFβ из 4-недельного токсикологического исследования на крысах.

[44] На **фиг. 12C** и **12D** показаны результаты микроскопии сердца, костей и легких по Ab3 и Ab2 по сравнению с ингибитором ALK5 или антителом к пан-TGFβ из 4-недельного токсикологического исследования на крысах.

[45] На **фиг. 13A-13D** представлена относительная экспрессия изоформ TGFβ.

[46] На **фиг. 13A** показана экспрессия изоформ TGFβ относительно нормальных образцов сравнения (в зависимости от типа рака).

[47] На **фиг. 13B** показана частота экспрессии изоформ TGFβ в зависимости от типа рака человека.

[48] На **фиг. 13C** показана экспрессия изоформ TGFβ в отдельных образцах опухолей в зависимости от типа рака.

[49] На **фиг. 13D** показана экспрессия изоформ TGFβ в линиях модели на мышиных сингенных раковых клетках.

[50] На **фиг. 14** представлен набор графиков, показывающих изменение роста опухоли (объем опухоли в $мм^3$), измеренное с течением времени (дни) после введения Ab3 в дозе 30 мг/кг или 10 мг/кг или Ab2 в дозе 3 мг/кг или 10 мг/кг в комбинации с анти-PD-1 ($P<0,05$, U-критерий Манна-Уитни), в модели опухоли MBT-2. В качестве контроля использовали только анти-PD-1.

[51] На **фиг. 15** изображен график, показывающий медианный объем опухоли ($мм^3$) в день 15 у мышей, которым вводили Ab3 в дозе 30 мг/кг или 10 мг/кг или Ab2 в дозе 3 мг/кг или 10 мг/кг в комбинации с анти-PD-1 ($P<0,05$, U-критерий Манна-Уитни) в модели опухоли MBT-2.

[52] На **фиг. 16** представлен график, показывающий медианные объемы опухоли S91 как функцию времени. Группы комбинаций представлены двумя различными изоформно-селективными ингибиторами TGFβ1 (Ab3 и Ab2) с двумя уровнями дозы, каждый в комбинации с анти-PD-1.

[53] На **фиг. 17A** и **17B** представлены репрезентативные иммуногистохимические срезы модели опухоли S91, окрашенные клеточным маркером CD8+. На **фиг. 17A** изображен срез опухоли животного, получавшего только анти-PD-1. На **фиг. 17B** изображен срез опухоли животного, получавшего как анти-PD-1, так и репрезентативный не зависящий от контекста ингибитор TGFβ1.

[54] На **фиг. 18A** и **18B** представлены репрезентативные иммуногистохимические срезы опухоли S91, окрашенные макрофагальным маркером. На **фиг. 18A** изображен срез опухоли животного, получавшего только анти-PD-1. На **фиг. 18B** изображен срез опухоли животного, получавшего как анти-PD-1, так и репрезентативный не зависящий от контекста ингибитор TGFβ1.

[55] На **фиг. 19** представлен график, показывающий ассоциацию и диссоциацию Ab2 с TGFβ1 C4S при различных pH.

[56] На **фиг. 20** представлено 2 графика, показывающих площадь пикосириуса красного (%) в срезах печени мышей на CDHFD, получавших Ab2 или контроль.

[57] На **фиг. 21** представлено 3 репрезентативных PSR-окрашенных изображения мышей на CDHFD, получавших Ab2 или контроль.

[58] На **фиг. 22** представлено два графика, показывающих содержание гидроксипролина (мкг/мг ткани) в печени мышей на CDHFD, получавших Ab2 или контроль.

[59] На **фиг. 23** представлено два графика, показывающих положительную по коллагену 1 типа площадь срезов печени мышей на CDHFD, получавших Ab2 или контроль.

[60] На **фиг. 24** представлен график, показывающий площадь пикосириуса красного (%) в срезах почки модели индуцированного аденином фиброза почек у крыс.

[61] На **фиг. 25** представлено 5 репрезентативных PSR-окрашенных изображений от контроля, мышей на CDHFD, получавших Ab2, ингибитор TGFβ3 или и то, и другое (слева); также представлен график, показывающий площадь пикосириуса красного (%) в срезах печени мышей на CDHFD, получавших Ab2, ингибитор TGFβ3 или и то, и другое, по сравнению с контролем (справа).

[62] На **фиг. 26** представлены иммуноцитохимические изображения клеток печени мыши, визуализированные с помощью 2 флуоресцентных меток: зеленая обозначает TGFβ1, а красная обозначает TGFβ3.

[63] На **фиг. 27** представлен график, показывающий данные клеточного анализа активности по репортерным клеткам. Активность TGFβ ингибируют повышением концентрации Ab2 или Ab46.

[64] На **фиг. 28** представлен график, показывающий соотношение фосфорилированных и общих SMAD2/3 в медиальной доле печени мышей на CDHFD. Наблюдали значительное снижение количества pSMAD2/3 в медиальной доле при всех протестированных дозах Ab46 ($p<0,05$ (t-критерий)).

[65] На **фиг. 29** представлен график, показывающий процентную долю (%) положительных по фосфо-SMAD2 (pSMAD2) ядер в печени мышей после 10 недель диеты с дефицитом холина и высоким содержанием жиров (CDHFD). Наблюдали значительное снижение % положительных по pSMAD2 ядер у мышей, получавших дозу Ab46 30 мг/кг.

[66] На **фиг. 30** представлен график, показывающий процентную долю (%) положительных по фосфо-SMAD2 (pSMAD2) ядер в печени крыс (левая латеральная доля) после 12 недель диеты CDHF. Человеческий IgG (HuNeg; отрицательный контроль) или Ab46 вводили в день 1 и день 3 после 12 недель CDHFD. За два часа до взятия крыс на анализ контрольной группе крыс давали ингибитор ALK5 (ALK5i; положительный контроль). Получение всех доз Ab46 (3 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг) приводило к подавлению фосфорилирования SMAD2, как и получение положительного контроля (ALK5i).

[67] На **фиг. 31** представлен график, показывающий процентную долю (%) положительных по фосфо-SMAD2 (pSMAD2) ядер в печени крыс после 12 недель диеты CDHF. Человеческий IgG (HuNeg; отрицательный контроль) или Ab46 в дозах 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг вводили в день 1 после 12 недель CDHFD. За два часа до взятия крыс на анализ контрольной группе крыс давали ингибитор ALK5 (ALK5i; положительный контроль). По-видимому, получение доз Ab46 10 мг/кг и 30 мг/кг полностью подавляло фосфорилирование SMAD2, как и получение положительного контроля (ALK5i).

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Определения

[68] Для облегчения понимания настоящего раскрытия сначала даны определения некоторых терминов. Эти определения должны быть прочитаны в свете остальной части настоящего раскрытия и так, как их понимает рядовой специалист в данной области техники. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, которое обычно понимается рядовым специалистом в данной области техники. Дополнительные определения приведены на протяжении всего подробного описания.

[69] *Распространенный рак, распространенное злокачественное образование*: Термин «распространенный рак» или «распространенное злокачественное образование» при использовании в настоящем документе имеет значение, понятное в рассматриваемой области техники, например, как оно понимается онкологами в контексте диагностики или лечения субъектов/пациентов с раком. Распространенное злокачественное образование с солидной опухолью может быть местнораспространенным или метастатическим. Термин «местнораспространенный рак» используют для описания рака (например, опухоли), который вырос за пределы органа, в котором он начался, но еще не распространился на отдаленные части тела. Таким образом, термин включает рак, который распространился от того места, где он начался, к близлежащим тканям или лимфатическим узлам. Напротив, «метастатический рак» представляет собой рак, который распространился из части тела, где он начался (первичный очаг), в другие части тела (например, отдаленные части).

[70] *Аффинность*: Аффинность представляет собой силу связывания молекулы (такой как антитело) со своим лигандом (таким как антиген). Ее обычно измеряют и указывают с помощью равновесной константы диссоциация (KD). В контексте взаимодействий антитело-антиген KD представляет собой отношение скорости диссоциации антитела («скорость распада» или Koff или Kdis), насколько быстро оно

диссоциирует от своего антигена, к скорости ассоциации антитела («скорость образования» или Kon), насколько быстро оно связывается со своим антигеном. Например, антитело с аффинностью ≤5 нМ характеризуется значением KD, которое составляет 5 нМ или меньше (то есть аффинность 5 нМ или выше), определенным с помощью подходящего анализа связывания *in vitro*. Для измерения значений KD антитела для его антигена можно применять подходящие анализы *in vitro*, такие как интерферометрия биослоев (BLI) и титрование при равновесии в растворе (например, MSD-SET).

[71] *Антитело*: Термин «антитело» охватывает любой встречающийся в природе, рекомбинантный, модифицированный или сконструированный иммуноглобулин или иммуноглобулиноподобную структуру или его антигенсвязывающий фрагмент или часть или их производное, как дополнительно описано в другом месте настоящего документа. Если не указано иное, термин «антиген» при использовании в настоящем документе должен охватывать антигенсвязывающие фрагменты и их функциональный варианты. Таким образом, данный термин относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном-мишенью и включает, например, химерные, гуманизированные, полностью человеческие и биспецифические антитела. Интактное антитело, как правило, содержит по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, но в некоторых случаях может включать меньше цепей, как например антитела, встречающиеся в природе у верблюдовых, которые могут содержать только тяжелые цепи. Антитела могут происходить исключительно из одного источника или могут быть «химерными», то есть различные части антитела могут происходить от двух различных антител. Антитела или их антигенсвязывающие части могут быть получены в гибридомах, методами рекомбинантной ДНК или ферментативным или химическим расщеплением интактных антител. Термин антитела при использовании в настоящем документе включает моноклональные антитела, биспецифические антитела, минитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в настоящем документе «миметиками антител»), химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слитые антитела (иногда называемые в настоящем документе «конъюгатами антител»), соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления термин также охватывает пептидные антитела.

[72] *Антиген*: Термин «антиген» в широком смысле включает любые молекулы, содержащие антигенную детерминанту в связывающем участке(ах), с которой специфически связывается антитело или связывающий фрагмент. Антиген может представлять собой единую молекулу (такую как белковый мономер или фрагмент) или комплекс, состоящий из нескольких компонентов. Антиген предоставляет эпитоп,

например молекулу, или часть молекулы, или комплекс молекул или частей молекул, который может быть связан селективным связывающим средством, таким как антигенсвязывающий белок (включая, например, антитело). Таким образом, селективное связывающее средство может специфически связываться с антигеном, который образован двумя или более компонентами в комплексе. Согласно некоторым вариантам осуществления антиген можно использовать у животного для получения антител, способных связываться с этим антигеном. Антиген может содержать один или несколько эпитопов, которые способны взаимодействовать с различными антигенсвязывающими белками, например антителами. В контексте настоящего изобретения подходящий антиген представляет собой комплекс (например, мультимерный комплекс, состоящий из нескольких компонентов в ассоциации), содержащий димер proTGF в ассоциации с презентирующей молекулой. Каждый мономер димера proTGF содержит продомен и домен фактора роста, разделенные последовательностью расщепления фурином. Два таких мономера образуют димерный комплекс proTGF. Он в свою очередь ковалентно связан с презентирующей молекулой через дисульфидные связи, которые включают остаток цистеина, присутствующий вблизи N-конца каждого из мономеров proTGF. Этот мультикомплекс, образованный димером proTGF, связанным с презентирующей молекулой, обычно называют большим латентным комплексом. Антигенный комплекс, подходящий для скрининга антител или антигенсвязывающих фрагментов, например, включает компонент презентирующей молекулы большого латентного комплекса. Такой компонент презентирующей молекулы может представлять собой полноразмерную презентирующую молекулу или ее фрагмент(ы). Минимальные необходимые части презентирующей молекулы обычно содержат по меньшей мере 50 аминокислот, но, более предпочтительно, по меньшей мере 100 аминокислот полипептида презентирующей молекулы, который содержит два остатка цистеина, способных образовывать ковалентные связи с димером proTGFβ1.

[73] *Антигенсвязывающая часть/фрагмент*: Термины «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, используемые в настоящем документе, относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, TGFβ1). Антигенсвязывающие части включают без ограничения любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающая часть антитела может быть получена, например, из полных молекул антител с помощью любых подходящих стандартных

методов, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методы генной инженерии, включающие манипуляции с ДНК, кодирующей вариабельные и, необязательно, константные домены антитела, и ее экспрессию. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих частей включают: (i) Fab-фрагменты, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')2-фрагменты, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd-фрагменты, состоящие из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагменты, состоящие из доменов VL и VH одного плеча антитела; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv) (смотри, например, Bird *et al.,* (1988) *Science* 242:423-426; и Huston *et al.,* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 85:5879-5883); (vi) dAb-фрагменты (смотри, например, Ward *et al.,* (1989) *Nature* 341: 544-546); и (vii) минимальные узнающие пептиды, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельный участок антитела (например, отдельный определяющий комплементарность участок (CDR)). Также охватываются другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела. Термин антигенсвязывающая часть антитела включает «одноцепочечный Fab-фрагмент», также известный как «scFab», который содержит вариабельный домен (VH) тяжелой цепи антитела, константный домен 1 (CH1) антитела, вариабельный домен (VL) легкой цепи антитела, константный домен (CL) легкой цепи антитела и линкер, причем упомянутые домены антитела и упомянутый линкер расположены в одном из следующих порядков в направлении от N-конца к C-концу: a) VH-CH1-линкер-VL-CL, b) VL-CL-линкер-VH-CH1, c) VH-CL-линкер-VL-CH1 или d) VL-CH1-линкер-VH-CL; и причем упомянутый линкер представляет собой полипептид из по меньшей мере 30 аминокислот, предпочтительно от 32 до 50 аминокислот.

[74] *Предпочтение*: в контексте настоящего изобретения, термин «предпочтение» относится к смещенной или неодинаковой аффинности в отношении или против подмножества антигенов, с которыми антитело способно специфически связываться. Например, говорят, что антитело характеризуется предпочтением, когда аффинность к одному антигенному комплексу и аффинность к другому антигенному комплексу не эквивалентны (например, аффинность различается более чем в пять раз). Предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению включают антитела «*с предпочтением матрикса*» (или «*с предпочтением LTBP*»), которые предпочтительно связывают EMC-ассоциированные комплексы (LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ), так что относительная аффинность по меньшей мере одного из матрикс-ассоциированных комплексов и по меньшей мере одного из клеточно-ассоциированных комплексов (комплексы GARP-proTGFβ1 и/или LRRC33-proTGFβ1) отличается более чем в пять раз.

Для сравнения, антитела, описываемые как антитела «*без предпочтения*», характеризуются приблизительно эквивалентной аффинностью в отношении таких антигенных комплексов (например, аффинность различается менее чем в пять раз).

[75] *Связывающий участок*: При использовании в настоящем документе «связывающий участок» представляет собой часть антигена (например, антигенного комплекса), которая при связывании с антителом или его фрагментом может образовывать область контакта при взаимодействии антитело-антиген. При связывании антитела связывающий участок становится «защищен» от нахождения на поверхности, что может быть обнаружено с помощью подходящих методов, таких как HDX-MS. Взаимодействие антитело-антиген может быть опосредовано несколькими (например, двумя или более) связывающими участками. Связывающий участок может содержать антигенную детерминанту или эпитоп.

[76] *Рак*: Термин «рак» при использовании в настоящем документе относится к физиологическому состоянию многоклеточных эукариот, которое обычно характеризуется нерегулируемой клеточной пролиферацией и злокачественным развитием. Термин в широком смысле охватывает злокачественные образования твердых и жидких тканей, включая опухоли, раки крови (например, лейкозы, лимфомы и миеломы), а также миелофиброз.

[77] *Клеточно-ассоциированный TGFβ1/proTGFβ1*: Термин относится к TGFβ1 или его сигнальному комплексу (например, proTGFβ1/латентному TGFβ1), который является мембраносвязанным (например, прикреплен к поверхности клетки). Обычно такая клетка представляет собой иммунную клетку. TGFβ1, который презентируется GARP или LRRC33, представляет собой клеточно-ассоциированный TGFβ1. GARP и LRRC33 представляют собой трансмембранные презентирующие молекулы, которые экспрессируются на клеточной поверхности некоторых клеток. GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1 можно вместе назвать «клеточно-ассоциированными» (или «поверхностноклеточными») комплексами proTGFβ1, которые опосредуют клеточно-ассоциированную (например, ассоциированную с иммунными клетками) активацию/сигнализацию TGFβ1. Термин также включает рекомбинантные очищенные комплексы GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1 в растворе (например, в анализе *in vitro*), которые физически не прикреплены к клеточным мембранам. Можно рассчитать средние значения KD антитела (или его фрагмента) и комплекса GARP-proTGFβ1 и комплекса LRRC33-proTGFβ1 для обобщенного представления аффинности к клеточно-ассоциированным (например, ассоциированным с иммунными клетками) комплексам proTGFβ1. Смотри, например, стобец (G) таблицы. Человеческий вариант презентирующей

молекулы или комплекса презентирующей молекулы может быть обозначен буквой «h» перед белком или белковым комплексом, например «hGARP», «hGARP-proTGFβ1», hLRRC33» и «hLRRC33-proTGFβ1».

[78] *Ингибитор контрольных точек*: В контексте настоящего раскрытия ингибиторы контрольных точек относятся к ингибиторам иммунным контрольных точек и имеют значение, известное в данной области техники. Как правило, мишенью является молекула рецептора на Т-клетках или NK-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». Поэтому изменение баланса иммунной системы посредством ингибирования контрольных точек должно позволить ей полностью активироваться для обнаружения и устранения рака. Наиболее известными ингибирующими рецепторами, участвующими в контроле иммунного ответа, являются антиген цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (CTLA-4), белок программируемой гибели клеток 1 (PD-1), PD-L1, домен Т-клеточного иммуноглобулина и домен муцина-3 (TIM3), ген 3 активации лимфоцитов (LAG3), иммуноглобулиноподобный рецептор естественных киллеров (KIR), глюкокортикоид-индуцированный рецептор фактора некроза опухоли (GITR) и содержащий V-домен иммуноглобулина (Ig) супрессор активации Т-клеток (VISTA). Неограничивающие примеры ингибиторов контрольных точек включают: ниволумаб, пембролизумаб, BMS-936559, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, ипилимумаб, тремелимумаб, IMP-321, BMS-986016 и лирилумаб. Одним примером ингибитора PD-1 является Keytruda®. Терапии или терапевтические схемы, в которых используется один или несколько ингибиторов иммунных контрольных точек, можно назвать терапией блокады контрольных точек (CBT).

[79] *Клиническая польза*: Предполагается, что при использовании в настоящем документе термин «клиническая польза» включает как эффективность, так и безопасность терапии. Таким образом, терапевтическое лечение, которое обеспечивает желаемую клиническую пользу, является как эффективным, так и безопасным (например, с переносимыми или приемлемыми токсичностью или нежелательными явлениями).

[80] *Комбинированная терапия*: «Комбинированная терапия» относится к схемам лечения по клиническим показаниям, которые включают два или более терапевтических средства. Таким образом, термин относится к терапевтической схеме, в которой первую терапию, включающая первую композицию (например, активный ингредиент), применяют у пациента в сочетании со второй терапией, включающей вторую композицию (активный ингредиент), предназначенной для лечения того же или частично совпадающего

заболевания или клинического состояния. Первая и вторая композиции могут вместе воздействовать на одну и ту же клеточную мишень или на разные клеточные мишени. Фраза «в сочетании с» в контексте комбинированной терапии означает, что у субъекта, получающего комбинированную терапию, терапевтические эффекты первой терапии частично совпадают во времени и/или в пространстве с терапевтическими эффектами второй терапии. Таким образом, комбинированная терапия может быть приготовлена в виде одного состава для одновременного введения или в виде отдельных составов для последовательного введения терапевтических средств. Когда субъекту, получившему первую терапию для лечения заболевания вводят второе терапевтическое средство для лечения того же заболевания, вторую терапию можно назвать «*дополнительной терапией*» или «*вспомогательной терапией*».

[81] *Комбинаторный эпитоп*: Комбинаторный эпитоп представляет собой эпитоп, который распознается и связывается комбинаторным антителом в сайте (то есть антигенной детерминанте), образованном несмежными частями компонента или компонентов антигена, которые в трехмерной структуре оказываются в непосредственной близости, образуя эпитоп. Таким образом, антитела согласно настоящему изобретению могут связывать эпитоп, образованный двумя или более компонентами (например, частями или сегментами) комплекса proTGFβ1/латентного TGFβ1. Комбинаторный эпитоп может содержать аминокислотный остаток (остатки) из первого компонента комплекса и аминокислотный остаток (остатки) из второго компонента комплекса и так далее. Каждый компонент может состоять из одного белка или из двух или более белков антигенного комплекса. Комбинаторный эпитоп образуется при участии в его структуре двух или более компонентов (например, частей или сегментов, таких как аминокислотные остатки) антигена или антигенного комплекса.

[82] *Конкурировать или перекрестно конкурировать*: Термин «конкурировать» при использовании в контексте антигенсвязывающих белков (например, антител или их антигенсвязывающих частей), которые конкурируют за один и тот же эпитоп, означает конкуренцию между антигенсвязывающими белками, определенную с помощью анализа, в котором тестируемый антигенсвязывающий белок предотвращает или ингибирует (например, уменьшает) специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка с обычным антигеном (например, TGFβ1 или его фрагментом). Для определения того, конкурирует ли один антигенсвязывающий белок с другим, можно использовать многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммунный анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ; твердофазный прямой

биотин-авидиновый EIA; твердофазный анализ с прямым мечением и твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением. Обычно, когда конкурирующий антигенсвязывающий белок присутствует в избытке, он ингибирует (например, снижает) специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка с обычным 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. В некоторых случаях связывание ингибируется по меньшей мере на 80-90%, по меньшей мере на 85%-95%, по меньшей мере на 95-99%. В некоторых случаях связывание ингибируется по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 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, согласно анализу с помощью BLI (такому как BIACORE® или OCTET®) при стандартных условиях испытаний, 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 содержать один и тот же эпитоп. Согласно другим вариантам осуществления первое антитело или его фрагмент и второе антитело или его фрагмент могут содержать не идентичные, но перекрывающиеся эпитопы. Согласно дополнительным вариантам осуществления первое антитело или его фрагмент и второе антитело или его фрагмент могут содержать отдельные (различные) эпитопы, которые находятся в непосредственной близости в трехмерном пространстве, так что связывание антитела перекрестно блокируется из-за стерических затруднений. «Перекрестная блокировка» означает, что связывание первого антитела с антигеном предотвращает связывание второго антитела с тем же антигеном, и, аналогичным образом, связывание второго антитела с антигеном предотвращает связывание первого антитела с тем же антигеном.

[83] *Определяющий комплементарность участок (CDR)*: При использовании в настоящем документе термин «CDR» относится к определяющему комплементарность участку в вариабельных последовательностях антитела. В каждом из вариабельных участков тяжелой цепи и легкой цепи есть три CDR, которые обозначают CDR1, CDR2 и CDR3 для каждого из вариабельных участков. Термин «набор CDR» при использовании в настоящем документе относится к группе из трех CDR, которые находятся в одном вариабельном участке, который может связывать антиген. Точные границы этих CDR определяют по-разному в зависимости от разных систем. Система, описанная Кабатом (Kabat *et al.,* (1987; 1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes

of Health, Bethesda, Md.) не только обеспечивает однозначную систему нумерации остатков, применимую к любому вариабельному участку антитела, но также дает точные границы остатков, определяющие три CDR. Эти CDR можно назвать CDR по Кабату. Чотиа с соавторами (Chothia & Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; и Chothia *et al.,* (1989) *Nature* 342: 877-883) обнаружили, что некоторые подчасти в CDR по Кабату принимают почти идентичные конформации пептидного остова, несмотря на большое разнообразие на уровне аминокислотной последовательности. Эти подчасти были обозначены как L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3 или H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, где "L" и "H" обозначают участки легкой цепи и тяжелой цепи, соответственно. Эти участки, которые можно назвать CDR по Чотиа, имеют границы, перекрывающиеся с CDR по Кабату. Другие границы, определяющие CDR, перекрывающиеся с CDR по Кабату, были описаны в документах Padlan (1995) *FASEB J.* 9: 133-139 и MacCallum (1996) *J. Mol. Biol.* 262(5): 732-45. Другие определения границ CDR могут не следовать строго одной из описанных в настоящем документе систем, но будут тем не менее перекрываться CDR по Кабату, хотя они могут быть укорочены или удлинены в свете предсказаний или экспериментальных данных о том, что определенные остатки или группы остатков или даже целые CDR не оказывают существенного влияния на связывание антигена (смотри, например, Lu X *et al.*, *MAbs.* 2019 Jan;11(1):45-57). В способах, применяемых в настоящем документе, могут использоваться CDR, определенные в соответствии с любой из этих систем, хотя в конкретных вариантах осуществления используют CDR, определенные по Кабату или Чотиа.

[84] *Конформационный эпитоп*: Конформационный эпитоп представляет собой эпитоп, который распознается и связывается конформационным антителом в трехмерной конформации, но не в развернутом пептиде с той же аминокислотной последовательностью. Конформационный эпитоп может быть назван конформационно-специфическим эпитопом, конформационно-зависимым эпитопом или конформационно-чувствительным эпитопом. Соответствующее антитело или его фрагмент, которые специфически связывают такой эпитоп, могут быть названы конформационно-специфическим антителом, конформационно-селективным антителом или конформационно-зависимым антителом. Связывание антигена с конформационным эпитопом зависит от трехмерной структуры (конформации) антигена или антигенного комплекса.

[85] *Константный участок/домен*: Константный домен иммуноглобулина относится к константному домену тяжелой или легкой цепи. Аминокислотные последовательности константных доменов тяжелой цепи и легкой цепи IgG человека известны в данной области техники.

[86] С *предпочтением контекста*: При использовании в настоящем документе «антитела с предпочтением контекста» относится к типу конформационных антител, которые связывают антиген с неодинаковой аффинностью, когда антиген ассоциирован (то есть связан или прикреплен) с взаимодействующим белком или его фрагментом. Таким образом, антитело с предпочтением контекста, которое специфически связывает эпитоп внутри proTGFβ1, может связывать LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1 с различной аффинностью. Например, говорят, что антитело «с предпочтением матрикса», если оно характеризуется более высокой аффинностью к матрикс-ассоциированным комплексам proTGFβ1 (например, LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ1), чем к клеточно-ассоциированным комплексам proTGFβ1 (например, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1). Отношение аффинности [матрикс-ассоциированные комплексы]:[клеточно-ассоциированные комплексы] можно получить взяв средние значения KD первых, взяв средние значения KD вторых и вычислив отношение этих двух значений, как показано в настоящем документе. Антитело с предпочтением контекста может также характеризоваться положительным или отрицательным предпочтением одного комплекса презентирующая молекула-proTGFβ1 относительно других комплексов презентирующая молекула-proTGFβ1, так что аффинность (измеренная с помощью KD) к первому комплексу более чем в 10 раз меньше или больше, чем среднее по остальным, соответственно.

[87] *Не зависящий от контекста*: Согласно настоящему раскрытию «не зависящее от контекста антитело», которое связывает proTGFβ1, характеризуется эквивалентной аффинностью в отношении четырех известных комплексов презентирующая молекула-proTGFβ1, а именно LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1. Не зависящие от контекста антитела также можно охарактеризовать как «без предпочтения» или «сбалансированные». Обычно не зависящие от контекста антитела демонстрируют не более чем пятикратное изменение аффинности, так что относительное отношение измеренных значений KD между матрикс-ассоциированными комплексами и клеточно-ассоциированными комплексами не превышают 5 при измерении с помощью подходящего анализа связывания *in vitro*, такого как поверхностный плазмонный резонанс, интерферометрия биослоев (BLI) и/или титрование при равновесии в растворе (например, MSD-SET).

[88] *Скорость диссоциации*: Термин скорость диссоциации при использовании в настоящем документе имеет значение, понятное специалисту в рассматриваемой области техники (например, в методах работы с антителами), как относящийся к кинетическому параметру, измеряемому по тому, насколько быстро/медленно лиганд (например, антитело

или фрагмент) диссоциирует от мишени связывания (например, антигена). Скорость диссоциации также называют скоростью «распада» («k_{OFF}»). Отношение скоростей образования/распада для антитела и его антигена (то есть k_{ON} и k_{OFF}) определяют общую силу взаимодействия или аффинность, обычно выражаемую как константа диссоциации или K_D. Поэтому эквивалентные значения аффинности (например, значения K_D) могут быть достигнуты за счет быстрой ассоциации (высокая k_{ON}), медленной диссоциация (низкая k_{OFF}) или благодаря вкладу обоих факторов. Одновалентные взаимодействия могут быть измерены с использованием моновалентных антигенсвязывающих молекул/фрагментов, таких как fAb (Fab), в то время как двухвалентные взаимодействия могут быть измерены с использованием двухвалентных антигенсвязывающих молекул, таких как целые иммуноглобулины (например, IgG).

[89] *ECM-ассоциированный TGFβ1/proTGFβ1*: Термин относится к TGFβ1 или его сигнальному комплексу (например, proTGFβ1/латентному TGFβ1), который является компонентом внеклеточного матрикса (например, депонирован в нем). TGFβ1, который презентируется LTBP1 или LTBP3, представляет собой ECM-ассоциированный TGFβ1. LTBP имеют решающее значение для правильного депонирования и последующей биодоступности TGFβ в ECM, где, как полагают, основными белками матрикса, ответственными за ассоциацию LTBP с ECM, являются фибриллин (Fbn) и фибронектин (FN). Можно рассчитать средние значения KD антитела (или его фрагмента) и комплекса LTBP1-proTGFβ1 и комплекса LTBP3-proTGFβ1 для обобщенного представления аффинности к ECM-ассоциированным (или матрикс-ассоциированным) комплексам proTGFβ1. Смотри, например, стобец (D) таблицы. Человеческий вариант презентирующей молекулы или комплекса презентирующей молекулы может быть обозначен буквой «h» перед белком или белковым комплексом, например «hLTBP1», «hLTBP1-proTGFβ1», «hLTBP3» и «hLTBP3-proTGFβ1».

[90] *Эффективное количество*: Термины «эффективный» и «терапевтически эффективный» относятся к достаточным способности или количеству для того, чтобы вызывать детектируемое изменение параметра заболевания, например замедление, приостановку, реверсирование, уменьшение или ослабление симптома или последующего эффекта заболевания. Термин охватывает, но не требует использования количества, которое полностью излечивает заболевание. Согласно некоторым вариантам осуществления «эффективное количество» (или терапевтически эффективное количество или терапевтическая доза) представляет собой дозировку, концентрацию или схему применения, которые обеспечивают статистически значимую клиническую пользу (например, эффективность) в популяции пациентов. Например, для антитела, для которого

показана эффективность в дозах от 3 мг/кг до 30 мг/кг в доклинических моделях, можно сказать, что эффективное количество составляет приблизительно 3-30 мг/кг.

[91] *Эффективное подавление опухоли*: Термин «эффективное подавление опухоли» можно применять для обозначения степени регрессии опухоли, достигаемой в ответ на лечение, когда, например, опухоль регрессирует на определенную часть (такую как <25%) конечного объема опухоли. Например, в конкретной модели, если конечный объем опухоли установлен на уровне 2000 $мм^3$, эффективное подавление опухоли достигается, если опухоль уменьшается до менее чем 500 $мм^3$, если пороговое значение составляет <25%. Поэтому эффективное подавление опухоли охватывает полную регрессию. Клинически эффективное подавление опухоли включает частичный ответ (PR) и полный ответ (CR) на основе принятых в данной области техники критериев, таких как RECIST 1.1 и соответствующий iRECIST. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное подавление опухоли в клинических условиях также включает стабилизацию заболевания, когда у опухолей, у которых обычно ожидается рост с определенной скоростью, предотвращают такой рост с помощью лечения, даже если не удается достигнуть уменьшения.

[92] *Эффекторные Т-клетки*: Эффекторные Т-клетки при использовании в настоящем документе представляют собой Т-лимфоциты, которые немедленно активно отвечают на стимул, такой как костимуляция, и включают без ограничения CD4+ Т-клетки (также называемые Т-хелперами или Th-клетками) и CD8+ Т-клетки (также называемые цитотоксическими Т-клетками). Th-клетки помогают другим белым клеткам крови в иммунологических процессах, включая созревание В-клеток в плазматические клетки и В-клетки памяти и активацию цитотоксических Т-клеток и макрофагов. Эти клетки также известны как CD4+ Т-клетки, поскольку они экспрессируют гликопротеин CD4 на своей поверхности. Хелперные Т-клетки активируются, когда им презентируют пептидные антигены посредством молекул MHC класса II, которые экспрессируются на поверхности антигенпрезентирующих клеток (APC). После активации они быстро делятся и секретируют небольшие белки, называемые цитокинами, которые регулируют активный иммунный ответ или помогают ему. Эти клетки могут дифференцироваться в один из нескольких подтипов, включая Th1, Th2, Th3, Th17, Th9 или TFh, которые секретируют различные цитокины для помощи различным типам иммунных ответов. Сигнализация от APC направляет Т-клетки в определенные подтипы. Цитотоксический (киллерный). Цитотоксические Т-клетки (ТС-клетки, CTL, Т-клетки-киллеры, киллерные Т-клетки), с другой стороны, разрушают инфицированные вирусами клетки и раковые клетки, а также участвуют в отторжении трансплантата. Эти клетки также известны как CD8+ Т-клетки,

поскольку они экспрессируют гликопротеин CD8 на своей поверхности. Эти клетки распознают свои мишени путем связывания с антигеном, ассоциированным с молекулами MHC класса I, которые присутствуют на поверхности всех ядерных клеток. Цитотоксические эффекторные клетки (например, CD8+ клетки) включают, например, перфорин и гранзим B.

[93] *Эпитоп*: Термин «эпитоп», также называемый антигенная детерминанта, представляет собой молекулярную детерминанту (например, полипептидную детерминанту), которая может специфически связываться связывающим средством, иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты включают химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, сахарные боковые цепи, фосфорил или сульфонил, и, согласно конкретным вариантам осуществления, могут иметь специфические характеристики трехмерной структуры и/или специфические характеристики заряда. Эпитоп, распознаваемый антителом или антигенсвязывающим фрагментом антитела, представляет собой структурный элемент антигена, который взаимодействует с CDR (например, сайтом комплементарности) антитела или фрагмента. Эпитоп может быть образован за счет вклада нескольких аминокислотных остатков, которые взаимодействуют с CDR антитела для обеспечения специфичности. Антигенный фрагмент может содержать более одного эпитопа. Согласно конкретным вариантам осуществления антитело специфически связывает антиген, когда оно распознает свой антиген-мишень в сложной смеси белков и/или макромолекул.

[94] *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.

[95] *Фиброзное микроокружение*: Термин «фиброзное микроокружение» относится к локальной нише заболевания в ткани, в которой *in vivo* возникает фиброз. Фиброзное микроокружение может включать ассоциированные с заболеванием молекулярные сигнатуры (набор хемокинов, цитокинов и так далее), ассоциированные с заболеванием клеточные популяции (такие как активированные макрофаги, MDSC и так далее), а также ассоциированные с заболеванием окружения ECM (изменения компонентов и/или структуры ECM). Фиброзное микроокружение, как полагают, поддерживает переход фибробластов в α-гладкомышечные актин-положительные миофибробласты TGFβ-зависимым образом. Фиброзное микроокружение может дополнительно характеризоваться инфильтрацией определенных иммунных клеток (таких как макрофаги и MDSC).

[96] *Комплекс GARP-TGFβ1*: При использовании в настоящем документе термин «комплекс GARP-TGFβ1» (или «комплекс GARP-proTGFβ1») относится к белковому

комплексу, содержащему пробелковую форму или латентную форму белка трансформирующего фактора роста β1 (TGFβ1) и белок с преобладанием повторов гликопротеина-А (GARP) или его фрагмент или вариант. Согласно некоторым вариантам осуществления пробелковую форму или латентную форму белка TGFβ1 можно назвать «белком proTGFβ1/латентным белком TGFβ1». Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс GARP-TGFβ1 содержит GARP, ковалентно связанный с proTGFβ1/латентным TGFβ1 через одну или несколько дисульфидных связей. В природе такие ковалентные связи образуются с остатками цистеина, присутствующими вблизи N-конца (например, в аминокислотном положении 4) димерного комплекса proTGFβ1. Согласно другим вариантам осуществления комплекс GARP-TGFβ1 содержит GARP, нековалентно связанный с proTGFβ1/латентным TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс GARP-TGFβ1 представляет собой встречающийся в природе комплекс, например комплекс GARP-TGFβ1 в клетке. Термин «hGARP» обозначает человеческий GARP.

[97] *Человеческое антитело*: Термин «человеческое антитело» при использовании в настоящем документе включает антитела, содержащие вариабельные и константные участки, происходящие от человеческих иммуноглобулиновых последовательностей зародышевого типа. Человеческие антитела согласно настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими иммуноглобулиновыми последовательностями зародышевого типа (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например в CDR и, в частности, в CDR3. Однако, термин «человеческое антитело» при использовании в настоящем документе не включает антитела, в которых последовательности CDR, происходящие от зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты к человеческим каркасным последовательностям.

[98] *Гуманизированное антитело*: Термин «гуманизированное антитело» относится к антителам, которые содержат последовательности вариабельных участков тяжелых и легких цепей от отличных от человека видов (например, мыши), но в которых по меньшей мере часть последовательности VH и/или VL была изменена так, чтобы стать более «человеческой», то есть более похожей на человеческие вариабельные последовательности зародышевого типа. Одним типом гуманизированного антитела является антитело с привитым CDR, в котором человеческие последовательности CDR введены в последовательности VH и VL отличных от человека видов для замены соответствующих последовательностей CDR отличных от человека видов. Также «гуманизированное

антитело» представляет собой антитело или его вариант, производное, аналог или фрагмент, которые иммуноспецифически связываются с представляющим интерес антигеном, и которые содержат FR-участок, имеющий по существу аминокислотную последовательность человеческого антитела, и участок CDR, имеющий по существу аминокислотную последовательность антитела отличного от человека вида. При использовании в настоящем документе термин "по существу" в контексте CDR относится к CDR с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной аминокислотной последовательности CDR антитела отличного от человека вида. Гуманизированное антитело содержит по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух вариабельных доменов (Fab, Fab', F(ab')2, FabC, Fv), в которых все или по существу все участки CDR соответствуют участкам иммуноглобулина отличного от человека вида (то есть, антитела-донора), а все или по существу все участки FR являются участками консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления гуманизированное антитело также содержит по меньшей мере часть Fc-участка иммуноглобулина, обычно человеческого иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам осуществления гуманизированное антитело содержит легкую цепь, а также по меньшей мере вариабельный домен тяжелой цепи. Антитело также может содержать участки тяжелой цепи CH1, шарнирный, CH2, CH3 и CH4. Согласно некоторым вариантам осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированную легкую цепь. Согласно некоторым вариантам осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированную тяжелую цепь. Согласно конкретным вариантам осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированный вариабельный домен легкой цепи и/или гуманизированную тяжелую цепь.

[99] *Масс-спектрометрия с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS)*: HDX-MS является хорошо известным методом, используемым для проверки конформации белка и белок-белковых взаимодействий в растворе путем измерения степени доступности растворителя. Смотри, например, Wei *et al.*, (2014) *Drug Discov Toda*y 19(1): 95-102. “Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics: methodology and applications”. Метод HDX-MS можно применять для определения участка или участков антигена, связанных с антителом (то есть, «связывающего участка (участков)»). Таким образом, такой связывающий участок (участки) может содержать или образовывать эпитоп.

[100] *Иммуносупрессия, иммуносупрессивный*: Термины относятся к способности подавлять иммунные клетки, такие как Т-клетки, NK-клетки и В-клетки. Золотым стандартом для оценки иммуносупрессивной функции является ингибирование активности Т-клеток, которое может включать антиген-специфическое подавление и неспецифическое подавление. Регуляторные Т-клетки (Treg) и MDSC можно рассматривать как иммуносупрессивные клетки. М2-поляризованные макрофаги (например, TAM) также можно характеризовать как иммуносупрессивные.

[101] *Изоформно-специфичный/селективный*: Термин «изоформная специфичность» или «изоформная селективность» относится к способности средства отличать одну изоформу от других структурно родственных изоформ (то есть к селективности). Изоформно-специфичный ингибитор TGFβ проявляет при заданной концентрации свое ингибирующее действие в отношении одной изоформы TGFβ, но не других изоформ TGFβ. Например, изоформно-специфичное антитело к TGFβ1 селективно связывает TGFβ1. TGFβ1-специфичный ингибитор (антитело) предпочтительно нацеливается (связывается и тем самым ингибирует) на изоформу TGFβ1, а не на TGFβ2 или TGFβ3 со значительно большей аффинностью. Например, селективность в этом контексте может относиться к по меньшей мере 500-1000-кратной разнице в соответствующих аффинностях, измеренных с помощью анализа связывания *in vitro*, такого как OCTET® и BIACORE®. Согласно некоторым вариантам осуществления селективность такова, что ингибитор при использовании в дозе, эффективной для ингибирования TGFβ1 *in vivo*, не ингибирует TGFβ2 и TGFβ3. Например, антитело может предпочтительно связывать TGFβ1 с аффинностью ~1 пМ, при том, что то же самое антитело может связывать TGFβ2 и/или TGFβ3 с ~0,5-50 нМ. Чтобы такой ингибитор был применим в качестве терапевтического средства, доза для достижения желаемых эффектов (например, терапевтически эффективные количества) должна находиться в диапазоне, в котором ингибитор может эффективно ингибировать изоформу TGFβ1, не ингибируя TGFβ2 или TGFβ3. Термины «изоформно-специфичный» и «изоформно-селективный» в настоящем документе используются взаимозаменяемо.

[102] *Выделенный*: «Выделенное» антитело при использовании в настоящем документе относится к антителу, которое по существу свободно от других антител, обладающих другой антигенной специфичностью. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное антитело по существу свободно от другого нежелательного клеточного материала и/или химических веществ.

[103] *Большой латентный комплекс*: Термин «большой латентный комплекс» («LLC») в контексте настоящего изобретения относится к комплексу, состоящему из

димера proTGFβ1, связанного с так называемой презентирующей молекулой. Таким образом, большой латентный комплекс представляет собой комплекс презентирующая молекула-proTGFβ1, такой как LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1. Такие комплексы могут быть образованы *in vitro* с использованием рекомбинантных очищенных компонентов, способных образовывать комплекс. Для целей скрининга презентирующие молекулы, используемые для образования таких LLC, необязательно должны быть полноразмерными полипептидами; однако обычно необходима часть белка, способная образовывать дисульфидные связи с димерным комплексом proTGFβ1 через остатки цистеина вблизи его N-концевых участков.

[104] *Ассоциированный с латентностью пептид (LAP)*: LAP представляет собой так называемый «продомен» proTGFβ1. Как более подробно описано в настоящем документе, LAP состоит из домена «смирительная рубашка» («Straight Jacket») и домена «рука» («Arm»). Сама «смирительная рубашка» далее делится на домены спираль альфа-1 и лассо латентности.

[105] *Лассо латентности*: При использовании в настоящем документе «лассо латентности», иногда также называемое петлей латентности, представляет собой домен в продомене proTGFb1, по бокам которого расположены спираль альфа-1 и «рука». В своей немутированной форме лассо латентности человеческого proTGFβ1 содержит аминокислотную последовательность LASPPSQGEVPPGPL (SEQ ID NO: 270). При использовании в настоящем документе термин «расширенный участок лассо латентности» относится к лассо латентности вместе с близлежащим С-концевым мотивом, называемым спираль альфа-2 (α2-спираль) продомена. Остаток пролина, который находится на С-конце лассо латентности, обеспечивает перпендикулярный «поворот», подобный «локтю», который соединяет петлю латентности с α2-спиралью. Некоторые высокоаффинные ингибиторы активации TGFβ1 связываются по меньшей мере частично с лассо латентности или его частью для обеспечения ингибирующей активности (например, способности блокировать активацию), причем, необязательно, часть лассо латентности представляет собой ASPPSQGEVPPGPL (SEQ ID NO: 286). Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению связывают комплекс proTGFβ1 в ASPPSQGEVPPGPL (SEQ ID NO: 286) или ее части. Некоторые высокоаффинные ингибиторы активации TGFβ1 связываются по меньшей мере частично с расширенным лассо латентности или его частью для обеспечения ингибирующей активности (например, способности блокировать активацию), причем, необязательно, часть расширенного лассо латентности представляет собой LASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTR (SEQ ID NO: 271).

[106] *Локализованный*: В контексте настоящего изобретения термин «локализованный» (как «локализованная опухоль») относится к анатомически изолированным или изолируемым аномалиям, таким как солидные злокачественные образования, в отличие от системного заболевания. Некоторые виды лейкоза, например, могут характеризоваться как локализованным компонентом (например, в костном мозге), так и системным компонентом (например, в циркулирующих клетках крови) заболевания.

[107] *Комплекс LRRC33-TGFβ1*: При использовании в настоящем документе термин «комплекс LRRC33-TGFβ1» (или «комплекс LRRC33-proTGFβ1») относится к комплексу из пробелковой формы или латентной формы белка трансформирующего фактора роста-β1 (TGFβ1) и содержащего богатые лейцином повторы белка 33 (LRRC33; также известен как отрицательный регулятор активных форм кислорода или NRROS) или его фрагмента или варианта. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LRRC33-TGFβ1 содержит LRRC33, ковалентно связанный с proTGFβ1/латентным TGFβ1 через одну или несколько дисульфидных связей. В природе такие ковалентные связи образуются с остатками цистеина, присутствующими вблизи N-конца (например, в аминокислотном положении 4) димерного комплекса proTGFβ1. Согласно другим вариантам осуществления комплекс LRRC33-TGFβ1 содержит LRRC33, нековалентно связанный с proTGFβ1/латентным TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LRRC33-TGFβ1 представляет собой встречающийся в природе комплекс, например комплекс LRRC33-TGFβ1 в клетке. Термин «hLRRC33» обозначает человеческий LRRC33.

[108] *Комплекс LTBP1-TGFβ1*: При использовании в настоящем документе, термин «комплекс LTBP1-TGFβ1» (или «комплекс LTBP1-proTGFβ1») относится к белковому комплексу, содержащему пробелковую форму или латентную форму белка трансформирующего фактора роста-β1 (TGFβ1) и связывающий латентный TGF-бета белок 1 (LTBP1) или его фрагмент или вариант. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LTBP1-TGFβ1 содержит LTBP1, ковалентно связанный с proTGFβ1/латентным TGFβ1 через одну или несколько дисульфидных связей. В природе такие ковалентные связи образуются с остатками цистеина, присутствующими вблизи N-конца (например, в аминокислотном положении 4) димерного комплекса proTGFβ1. Согласно другим вариантам осуществления комплекс LTBP1-TGFβ1 содержит LTBP1, нековалентно связанный с proTGFβ1/латентным TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LTBP1-TGFβ1 представляет собой встречающийся в природе комплекс, например комплекс LTBP1-TGFβ1 в клетке. Термин «hLTBP1» обозначает человеческий LTBP1.

[109] *Комплекс LTBP3-TGFβ1*: При использовании в настоящем документе термин «комплекс LTBP3-TGFβ1» (или «комплекс LTBP3-proTGFβ1») относится к белковому

комплексу, содержащему пробелковую форму или латентную форму белка трансформирующего фактора роста-β1 (TGFβ1) и связывающий латентный TGF-бета белок 3 (LTBP3) или его фрагмент или вариант. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LTBP3-TGFβ1 содержит LTBP3, ковалентно связанный с proTGFβ1/латентным TGFβ1 через одну или несколько дисульфидных связей. В природе такие ковалентные связи образуются с остатками цистеина, присутствующими вблизи N-конца (например, в аминокислотном положении 4) димерного комплекса proTGFβ1. Согласно другим вариантам осуществления комплекс LTBP3-TGFβ1 содержит LTBP1, нековалентно связанный с proTGFβ1/латентным TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LTBP3-TGFβ1 представляет собой встречающийся в природе комплекс, например комплекс LTBP3-TGFβ1 в клетке. Термин «hLTBP3» обозначает человеческий LTBP3.

[110] *М2 или М2-подобный макрофаг*: М2-макрофаги представляют собой подмножество активированных или поляризованных макрофагов и включают ассоциированные с заболеванием макрофаги как в фиброзном, так и в опухолевом микроокружении. Маркеры клеточной поверхности для М2-поляризованных макрофагов обычно включают CD206 и CD163 (то есть CD206+/CD163+). Заявитель недавно обнаружил, что М2-поляризованные макрофаги могут также экспрессировать поверхностноклеточный LRRC33. Активации М2-макрофагов способствуют в основном IL-4, IL-13, IL-10 и TGFβ; они секретируют те же цитокины, которые их активируют (IL-4, IL-13, IL-10 и TGFβ). Эти клетки характеризуются высокой фагоцитирующей способностью и продуцируют компоненты ECM, ангиогенные и хемотаксические факторы. Высвобождение TGFβ макрофагами может поддерживать активацию миофибробластов, индукцию EMT и EndMT в фиброзной ткани. Например, М2-макрофаги существенны для TGFβ-зависимого фиброза легких, а также присутствуют в большом количестве в ряде опухолей.

[111] *Матрикс-ассоциированный proTGFβ1*: LTBP1 и LTBP3 представляют собой презентирующие молекулы, которые являются компонентами внеклеточного матрикса (ECM). LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ1 можно вместе назвать «ECM-ассоциированными» (или «матрикс-ассоциированными») комплексами proTGFβ1, которые опосредуют ECM-ассоциированную активацию/сигнализацию TGFβ1. Термин также включает рекомбинантные очищенные комплексы LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ1 в растворе (например, в анализах *in vitro*), которые физически не прикреплены к матриксу или субстрату.

[112] *Максимально допустимая доза (MTD)*: Термин MTD обычно относится в контексте соображений безопасности/токсикологии к максимальному количеству

тестируемого препарата (такого как ингибитор TGFβ1), оцененному по уровню отсутствия наблюдаемых нежелательных явлений (NOAEL). Например, NOAEL для Ab2 у крыс на основании четырехнедельного токсикологического исследования представлял собой наивысшую оцененную дозу (100 мг/кг), что позволяет предположить, что MTD для Ab2 составляет >100 мг/кг.

[113] *Meso-Scale Discovery*: «Meso-Scale Discovery» или «MSD» представляет собой тип иммунологического анализа, в котором используют высокосвязывающие углеродные электроды для захвата белков (например, антител). Антитела можно инкубировать с определенными антигенами, связывание которых можно детектировать с помощью вторичных антител, конъюгированных с электрохемилюминесцентными метками. По электрическому сигналу можно измерять интенсивность света для количественного определения аналитов в образце.

[114] *Миелофиброз*: «Миелофиброз», также известный как остеомиелофиброз, представляет собой относительно редкое пролиферативное нарушение в костном мозге (например, рак), которое принадлежит к группе заболеваний, называемых миелопролиферативными нарушениями, и включает первичный миелофиброз и вторичный миелофиброз. Миелофиброз, характеризующийся пролиферацией аномального клона гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге и других участках, приводит к фиброзу или замещению костного мозга рубцовой тканью. Миелофиброз характеризуется мутациями, которые вызывают повышающую регуляцию или сверхактивацию нисходящего пути JAK.

[115] *Супрессорная клетка миелоидного происхождения*: Супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) представляют собой гетерогенную популяцию клеток, образующихся при различных патологических состояниях, и считается, что они являются патологическим состоянием активации моноцитов и относительно незрелых нейтрофилов. MDSC включают по меньшей мере две категории клеток, называемые i) «гранулоцитарными» (G-MDSC) или полиморфноядерными (PMN-MDSC), которые фенотипически и морфологически сходны с нейтрофилами; и ii) моноцитарными (M-MDSC), которые фенотипически и морфологически сходны с моноцитами. MDSC характеризуются четким набором геномных и биохимических признаков, и их могут различать специфические поверхностные молекулы. Например, человеческие G-MDSC/PMN-MDSC обычно экспрессируют маркеры клеточной поверхности CD11b, CD33, CD15 и CD66. Кроме того, человеческие G-MDSC/PMN-MDSC также могут экспрессировать HLA-DR и/или аргиназу. Для сравнения, человеческие M-MDSC обычно экспрессируют маркеры клеточной поверхности CD11b, CD33 и CD14. MDSC также могут

экспрессировать CD39 и CD73 для опосредования аденозиновой сигнализации, участвующей в фиброзе органов (таком как фиброз печени и фиброз легких), раке и миелофиброзе. Кроме того, человеческие M-MDSC также могут экспрессировать HLA-DR. Помимо таких маркеров клеточной поверхности MDSC характеризуются способностью подавлять иммунные клетки, такие как Т-клетки, NK-клетки и B-клетки. Иммуносупрессорные функции MDSC могут включать ингибирование антиген-неспецифической функции и ингибирование антиген-специфической функции. MDSC могут экспрессировать поверхностноклеточный LRRC33 и/или LRRC33-proTGFβ1.

[116] *Миофибробласт*: Миофибробласты представляют собой клетки с определенными фенотипами фибробластов и клеток гладкой мускулатуры и обычно экспрессируют виментин, альфа-гладкомышечный актин (α-SMA; человеческий ген ACTA2) и паладин. При многих болезненных состояниях, связанных с дисрегуляцией внеклеточного матрикса (такой как повышение жесткости матрикса), нормальные клетки фибробластов дедифференцируются в миофибробласты TGFβ-зависимым образом. При миофибробласт-зависимых патологиях распространена аберрантная сверхэкспрессия TGFβ. Известно, что TGFβ способствует дифференцировке миофибробластов, пролиферации клеток и производству матрикса. Миофибробласты или миофибробласт-подобные клетки в фиброзном микроокружении можно назвать фиброз-ассоциированными фибробластами (или «FAF»), а миофибробласты или миофибробласт-подобные клетки в опухолевом микроокружении можно назвать рак-ассоциированными фибробластами (или «CAF»).

[117] Скорость распада *(k_{OFF})*: Скорость распада представляет собой кинетический параметр, показывающий, как быстро или как медленно антитело (такое как mAb) или антигенсвязывающий фрагмент (такой как fAb) диссоциируют от своего антигена, и она также может называться скоростью диссоциации. Скорость диссоциации можно экспериментально измерять в подходящих анализах связывания *in vitro*, таких как системы на основе OCTET® и BIACORE®.

[118] Пан-*ингибитор TGFβ/пан-ингибирование TGFβ*: Термин «ингибитор пан-TGFβ» или «пан-ингибитор TGFβ» относится к любому средству, которое способно ингибировать все три изоформы TGFβ или противодействовать им. Такой ингибитор может представлять собой низкомолекулярный ингибитор изоформ TGFβ. Термин включает антитело к пан-TGFβ, что относится к любому антителу, способному связываться с каждой изоформ TGFβ, то есть с TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к пан-TGFβ связывает и нейтрализует активность всех трех изоформ, то есть активность TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3. Антитело 1D11 (или человеческий

аналог фрезолимумаб (GC1008)) является хорошо известным примером антитела к пан-TGFβ, которое нейтрализует все три изоформы TGFβ. Примеры низкомолекулярных пан-ингибиторов TGFβ включают галунисертиб (моногидрат LY2157299, CAS № 700874-72-2), который является антагонистом киназы-рецептора I TGFβ/ALK5, который опосредует сигнализацию всех трех изоформ TGFβ.

[119] *Активность*: Термин «активность» при использовании в настоящем документе относится к активности лекарственного средства, такого как ингибирующее антитело (или фрагмент), обладающего ингибирующим действием, с учетом концентрации или количества лекарственного средства для получения определенного эффекта. Например, антитело, способное оказывать определенные эффекты при заданной дозировке, является более активным, чем другое антитело, которому требуется удвоенное количество (дозировка) для получения эквивалентных эффектов. Активность может быть измерена в клеточных анализах, таких как анализы активации/ингибирования TGFβ, при этом степень активации TGFβ, такой как активация, вызванная связыванием интегрина, может быть измерена в присутствии или в отсутствие тестируемого вещества (например, ингибирующих антител) в клеточной системе. Как правило, среди антител, которые способны связываться с одними и теми же или перекрывающимися связывающими участками антигена (например, перекрестно-блокирующие антитела), антитела с более высокой аффинностью (низкими значениями K_D) имеют тенденцию демонстрировать более высокую активность, чем антитела с более низкой аффинностью (большими значениями K_D).

[120] *Прогностический биомаркер:* Прогностические биомаркеры предоставляют информацию о возможности или вероятности ответа на конкретную терапию. Как правило, прогностический биомаркер измеряют до и после лечения, и изменения или относительные уровни маркера в образцах, взятых у субъекта, указывают на терапевтическую пользу или предсказывают ее.

[121] *Презентирующая молекула*: Презентирующие молекулы в контексте настоящего изобретения относятся к якорным белкам, которые могут образовывать ковалентные связи с латентными пробелками (например, proTGFβ1) и «презентировать» неактивный комплекс во внеклеточной нише (такой как ECM или поверхность иммунных клеток), тем самым сохраняя их латентность до тех пор, пока не произойдет событие активации. Известные презентирующие молекулы для proTGFβ1 включают: LTBP1, LTBP3, GARP (также известный как LRRC32) и LRRC33, которые могут образовывать комплексы презентирующая молекула-proTGFβ1 (LLC), а именно LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1, соответственно. В природе

LTBP1 и LTBP3 являются компонентами внеклеточного матрикса (ECM); следовательно, LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ1 можно вместе назвать «ECM-ассоциированными» (или «матрикс-ассоциированными») комплексами proTGFβ1, которые опосредуют ECM-ассоциированную сигнализацию/активность TGFβ1. GARP и LRRC33, с другой стороны, являются трансмембранными белками, экспрессируемыми на клеточной поверхности определенных клеток; следовательно, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1 можно вместе назвать «клеточно-ассоциированными» (или «поверхностноклеточными») комплексами proTGFβ1, которые опосредуют клеточно-ассоциированную (например, ассоциированную с иммунными клетками) сигнализацию/активность TGFβ1.

[122] *Защита (от воздействия растворителя)*: В контексте оценки белок-белковых взаимодействий, таких как связывание антитело-антиген, с помощью HDX-MS, степень, в которой белок (например, участок белка, содержащий эпитоп) подвергается воздействию растворителя, что позволяет происходить протонному обмену, обратно пропорциональна степени связывания/взаимодействия. Поэтому, когда антитело, описанное в настоящем документе, связывается с участком антигена, связывающий участок «защищен» от воздействия растворителя, поскольку белок-белковое взаимодействие исключает доступ окружающего растворителя к связывающему участку. Таким образом, защищенный участок указывает на место взаимодействия. Как правило, подходящие растворители представляют собой физиологические буферы.

[123] *ProTGFβ1*: Термин «proTGFβ1» при использовании в настоящем документе охватывает формы-предшественники неактивного димерного комплекса TGFβ1, который содержит в комплексе последовательность продомена TGFβ1. Таким образом, термин может включать про-, а также латентные формы TGFβ1. Выражения «proTGFβ1/латентный TGFβ1» можно применять взаимозаменяемо. «Про» форма TGFβ1 существует до протеолитического расщепления по фуриновому сайту. После расщепления полученную форму называют «латентной» формой TGFβ1. «Латентный» комплекс остается ассоциированным до тех пор, пока не сработает дополнительный триггер активации, такой как вызванное интегрином событие активации. Комплекс proTGFβ1 состоит из полипептидов димерного пробелка TGFβ1, связанных дисульфидными связями. Латентный димерный комплекс ковалентно связан с одной презентирующей молекулой через остаток цистеина в положении 4 (Cys4) каждого из полипептидов proTGFβ1. Прилагательное «латентный» можно применять в общем для описания «неактивного» состояния TGFβ1 до опосредованных интегрином или других событий активации. Полипептид proTGFβ1 содержит продомен (LAP) и домен фактора роста (SEQ ID NO: 24).

[124] *Регрессия*: Регрессию опухоли или роста опухоли можно использовать как меру эффективности *in vivo*. В доклинических условиях медианный объем опухоли (MTV) и критерии эффективности лечения, направленного на регрессионный ответ, могут быть определены по объемам опухоли у животных, оставшихся в исследовании в последний день. Эффективность лечения также может быть определена по частоте и выраженности регрессионных ответов, наблюдаемых в ходе исследования. Лечение может вызывать частичную регрессию (PR) или полную регрессию (CR) опухоли у животного. Полную регрессию, достигнутую в ответ на терапию (например, введение лекарственного средства) можно назвать «полным ответом», а субъекта, достигшего полного ответа, можно назвать «полностью отвечающим». Согласно некоторым вариантам осуществления доклинических моделей опухоли PR-ответ определяют как объем опухоли, который составляет 50% или менее от ее объема в день 1 в трех последовательных измерениях в ходе исследования и равен или превышает 13,5 мм^3 в одном или нескольких из этих трех измерениях. Согласно некоторым вариантам осуществления CR-ответ определяют как объем опухоли, который менее 13,5 мм^3 в трех последовательных измерениях в ходе исследования. В доклинической модели животное с CR-ответом по окончании исследования может быть дополнительно классифицировано как выжившее без опухоли (TFS). Термин «эффективное подавление опухоли» можно применять для обозначения степени регрессии опухоли, достигаемой в ответ на лечение, когда, например, объем опухоли уменьшается до <25% от конечного объема опухоли. Например, в конкретной модели, если конечный объем опухоли составляет 2000 мм^3, эффективное подавление опухоли достигается, если опухоль уменьшилась до менее чем 500 мм^3. Следовательно, эффективное подавление опухоли охватывает полную регрессию, а также частичную регрессию, достигающую порогового уменьшения. Аналогично, регрессию фиброза можно применять как меру эффективности *in vivo* терапии, такой как терапия ингибитором TGFβ1. Регрессия фиброзных состояний может быть определена на основании стандартных критериев оценки тяжести фиброзных проявлений по стадиям заболевания.

[125] *Регуляторные Т-клетки*: «Регуляторные Т-клетки», или Treg, представляют собой тип иммунных клеток, характеризующийся 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 собственным антигенам и предотвращают аутоиммунное заболевание. Treg иммуносупрессивны и обычно подавляют или понижающе регулируют индукцию и пролиферацию эффекторных Т-клеток (Teff). Treg могут развиваться в тимусе (так называемые CD4+ Foxp3+ «естественные» Treg) или дифференцироваться из наивных

CD4+ Т-клеток на периферии, например после воздействия TGFβ или ретиноевой кислоты. Treg могут экспрессировать поверхностноклеточный GARP-proTGFβ1.

[126] *Резистентность (к терапии)*: Резистентность к конкретной терапии (такой как CBT) может быть обусловлена присущими заболеванию, такому как рак, характеристиками («первичная резистентность») или приобретенными фенотипами, которые развиваются со временем после лечения («приобретенная резистентность»). О пациентах, которые не проявляют терапевтического ответа на терапию (например, тех, которые не отвечает или слабо отвечает на терапию), говорят, что они характеризуются первичной резистентностью к терапии и могут быть названы первично не отвечающими. О пациентах, у которых первоначально наблюдают терапевтический ответ на терапию, но позже эффект пропадает (например, прогрессирование или рецидив, несмотря на продолжение терапии), говорят, что они характеризуются приобретенной резистентностью к терапии.

[127] *Критерии оценки ответа при солидных опухолях (RECIST) и iRECIST*: RECIST представляет собой набор опубликованных правил, которые определяют, когда опухоли у пациентов с раком улучшаются («отвечают»), остаются такими же («стабилизируются») или ухудшаются («прогрессируют») во время лечения. Критерии были опубликованы в феврале 2000 г. в результате международного сотрудничества, включавшего Европейскую организацию по исследованию и лечению рака (EORTC), Национальный институт рака США и Группу клинических испытаний Национального института рака Канады. Впоследствии была широко адаптирована пересмотренная версия руководства RECIST (RECIST v 1.1) (смотри Eisenhauera *et al.,* (2009), “New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1)” *Eur J Cancer* 45: 228-247, включено в настоящий документ). Критерии ответа следующие: Полный ответ (CR): Исчезновение всех целевых очагов поражения; Частичный ответ (PR): Снижение по меньшей мере на 30% суммы LD целевых очагов поражения при отсчете от исходной суммы LD; Стабильное заболевание (SD): Нет ни достаточного уменьшения, чтобы отвечать условиям PR, ни достаточного увеличения, чтобы отвечать условиям PD, при отсчете от наименьшей суммы LD с начала лечения; Прогрессирующее заболевание (PD): Увеличение по меньшей мере на 20% суммы LD целевых очагов поражения при отсчете от наименьшей суммы LD с начала лечения или появление одного или нескольких новых очагов поражения. С другой стороны, iRECIST предоставляет модифицированный набор критериев, учитывающих иммунный ответ. Смотри www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5648544/. Критерии RECIST и iRECIST стандартизированы, могут время от времени пересматриваться по мере поступления дополнительных данных и хорошо изучены в данной области техники.

[128] *Солидная опухоль*: Термин «солидная опухоль» относится к пролиферативным нарушениям, приводящим к аномальному росту или массе ткани, которая обычно не содержит кист или жидких областей. Солидные опухоли могут быть доброкачественными (нераковыми) или злокачественными (раковыми). Солидные опухоли обычно состоят из нескольких типов клеток, включая без ограничения раковые (злокачественные) клетки, стромальные клетки, такие как CAF, и инфильтрирующие лейкоциты, такие как макрофаги и лимфоциты. Солидные опухоли, подлежащие лечению изоформно-селективным ингибитором TGFβ1, таким как описанные в настоящем документе, обычно представляют собой TGFβ1-положительные (TGFβ1+) опухоли.

[129] *Титрование при равновесии в растворе (SET)*: SET представляет собой анализ, посредством которого можно измерять связывание между двумя молекулами (такими как антиген и антитело, которое связывает данный антиген) в равновесии в растворе. Например, SET на основе Meso-Scale Discovery («MSD»), или MSD-SET, является полезным способом определения констант диссоциации для особенно высокоаффинных белок-белковых взаимодействий в равновесии, таких как связывание антител с пикомолярной аффинностью с их антигенами (смотри, например, Ducata *et al.,* (2015) *J Biomolecular Screening* 20(10): 1256-1267). Анализы на основе SET особенно полезны для определения значений KD антител с субнаномолярной (например, пикомолярной) аффинностью.

[130] *Специфическое связывание*: При использовании в настоящем документе термин «специфическое связывание» или «специфически связывает» означает, что взаимодействие антитела или его антигенсвязывающей части с антигеном или аминокислотным остатком зависит от присутствия определенной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа). Например, антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с конкретным белком, а не с белками вообще. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связывается с мишенью, например с TGFβ1, если антитело характеризуется KD с мишенью по меньшей мере приблизительно 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М или менее. Согласно некоторым вариантам осуществления термины «специфическое связывание с эпитопом proTGFβ1», «специфически связывается с эпитопом proTGFβ1», «специфическое связывание с proTGFβ1» или «специфически связывается с proTGFβ1» при использовании в настоящем документе относятся к антителу или его антигенсвязывающей части, которые связываются с proTGFβ1 и характеризуются константой диссоциации (KD) $1{,}0\times10^{-8}$ М или менее, определенной с помощью подходящих анализов связывания *in vitro*. Согласно одному варианту осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть могут

специфически связываться с ортологами proTGFβ1 как человека, так и отличных от человека видов (например, мыши).

[131] *Субъект*: Термин «субъект» в контексте терапевтических применений относится к индивидууму, который получает клиническую помощь или вмешательство, такое как лечение, диагностика и так далее. Подходящие субъекты включают позвоночных, включая без ограничения млекопитающих (например, человека и отличных от человека млекопитающих). Если субъект является человеком, можно взаимозаменяемо использовать термин «пациент». В клиническом контексте термины «популяция пациентов» или «субпопуляция пациентов» используют для обозначения группы индивидуумов, которые отвечают набору критериев, таких как клинические критерии (например, проявления заболевания, стадии заболевания, восприимчивость к определенным состояниям, реагирование на терапию и так далее), история болезни, состояние здоровья, пол, возрастная группа, генетические критерии (например, носительство определенной мутации, полиморфизма, дупликации генов, повторов последовательности ДНК и так далее) и факторы образа жизни (например, диета, курение, употребление алкоголя, физические упражнения и так далее).

[132] *Взаимодействие с мишенью*: При использовании в настоящем документе термин взаимодействие с мишенью относится к способности молекулы (например, ингибитора TGFβ) связываться со своей предполагаемой мишенью in vivo (например, с эндогенным TGFβ). В случае ингибиторов активации предполагаемой мишенью может быть большой латентный комплекс.

[133] *Связанное с TGFβ1 показание*: «Связанное с TGFβ1 показание» означает любое заболевание, нарушение и/или состояние, связанное с экспрессией, активностью и/или метаболизмом TGFβ1, или любое заболевание, нарушение и/или состояние, при котором может быть полезно ингибирование активности и/или уровней TGFβ1. Некоторые связанные с TGFβ1 показания обусловлены преимущественно изоформой TGFβ1. Связанные с TGFβ1 показания включают, но без ограничения: фиброзные состояния (такие как фиброз органов и фиброз тканей, сопровождающийся хроническим воспалением), пролиферативные нарушения (такие как рак, например солидные опухоли и миелофиброз), заболевания, ассоциированные с дисрегуляцией ECM (такие как состояния, связанные с повышением жесткости и ремоделированием матрикса), заболевание, связанное с эндотелиально-мезенхимальным переходом (EndMT), заболевание, связанное с эпителиально-мезенхимальным переходом (EMT), заболевание, связанное с протеазами, заболевание с аберрантной экспрессией генов определенных маркеров, описанных в

настоящем документе. Не предполагается, что эти категории заболеваний являются взаимоисключающими.

[134] *Ингибитор TGFβ*: Термин «ингибитор TGFβ» в широком смысле относится к любому средству, способному противодействовать биологической активности, сигнализации или функции фактора роста TGFβ (например, TGFβ1, TGFβ2 и/или TGFβ3). Термин не предназначен для ограничения механизма действия и включает, например, нейтрализующие антитела, антагонисты рецепторов (например, ингибиторы киназ), растворимые ловушки лигандов и ингибиторы активации TGFβ. Неселективные ингибиторы TGFβ обычно называют «пан-ингибиторами» TGFβ. Ингибиторы TGFβ также включают антитела, которые способны снижать доступность латентного proTGFβ, который может быть активирован в нише, например путем индукции антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и/или антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADPC), а также антитела, которые приводят к интернализации комплекса клеточной поверхности, содержащего латентный proTGFβ, тем самым удаляя предшественник с плазматической мембраны без истощения самих клеток. Интернализация может быть подходящим механизмом действия для LRRC33-содержащих белковых комплексов (таких как человеческий LRRC33-proTGFβ1), что приводит к снижению уровня клеток, экспрессирующих LRRC33-содержащие белковые комплексы на клеточной поверхности.

[135] *«Семейство TGFβ»* представляет собой класс в суперсемействе TGFβ и у людей содержит три члена: TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3, которые структурно схожи и кодируются отдельными генами. Известно, что эти три фактора роста передают сигналы через одни и те же рецепторы.

[136] *Терапевтическое окно*: Термин «Терапевтическое окно» относится к диапазону доз/концентраций, которые производят терапевтический ответ, не вызывая значительных/наблюдаемых/неприемлемых нежелательных явлений (например, в пределах допустимых или переносимых нежелательных явлений) у субъектов. Терапевтическое окно можно рассчитать как отношение минимальной эффективной концентрации (MEC) к минимальной токсической концентрации (MTC). Для иллюстрации, ингибитор TGFβ1, который достигает эффективности *in vivo* при дозе 10 мг/кг и демонстрирует переносимость или приемлемую токсичность при дозе 100 мг/кг, обеспечивает по меньшей мере 10-кратное (например, 10x) терапевтическое окно. Напротив, говорят, что пан-ингибитор TGFβ, который эффективен при дозе 10 мг/кг, но вызывает нежелательные явления при дозе 5 мг/кг, характеризуется «дозолимитирующей токсичностью». Например, было показано, что Ab2 эффективно в дозировке в диапазоне от приблизительно <3 до 30 мг/кг в неделю, а

также было показано отсутствие наблюдаемой токсичности, связанной с пан-ингибированием TGFβ, при дозе по меньшей мере 100 мг/кг в неделю в течение 4 недель в доклинических моделях, таких как крысы. Исходя из этого, Ab2 демонстрирует как минимум 3,3-кратное и вплоть до 33-кратного терапевтическое окно.

[137] *Токсичность*: При использовании в настоящем документе термин «токсичность» относится к нежелательным эффектам *in vivo* у субъектов (например, пациентов), связанным с терапией, получаемой субъектами (например, пациентами), таким как нежелательные побочные эффекты и нежелательные явления. «Переносимость» относится к уровню токсичности, связанному с терапией или терапевтической схемой, которые могут быть нормально перенесены пациентами без прекращения терапии из-за токсичности. Как правило, исследования токсичности/токсикологические исследования проводят на одной или нескольких доклинических моделях до клинической разработки для оценки профилей безопасности лекарственного средства-кандидата (например, терапии моноклональными антителами). Исследования токсичности/токсикологические исследования могут помочь определить «*уровень отсутствия наблюдаемых нежелательных явлений (NOAEL)*» и «*максимально допустимую дозу (MTD)*» тестируемого вещества, на основании которых можно вывести терапевтическое окно. Предпочтительно, в качестве доклинической модели на животных, в которой следует проводить исследование безопасности/токсичности, следует выбирать вид, который показал свою чувствительность к конкретному вмешательству. В случае ингибирования TGFβ подходящие виды включают крыс, собак и яванских макаков. Сообщают, что мыши менее чувствительны к фармакологическому ингибированию TGFβ и могут не проявлять токсичности, которая потенциально опасна для других видов, включая человека, хотя некоторые исследования сообщают о токсичности, наблюдаемой при пан-ингибировании TGFβ у мышей. Для иллюстрации в контексте настоящего изобретения, NOAEL для Ab2 у крыс в четырехнедельном токсикологическом исследовании представлял собой наивысшую оцененную дозу (100 мг/кг), что позволяет предположить, что MTD составляет >100 мг/кг.

[138] *Лечить/лечение*: Термин «лечить» или «лечение» включает терапевтическое лечение, профилактическое лечение и применения, при которых снижается риск развития у субъекта нарушения или другого фактора риска. Таким образом, термин в широком смысле означает: достижение терапевтической пользы у пациента, например, путем замедления прогрессирования заболевания, обращения вспять определенных признаков заболевания, нормализации экспрессии генов, усиления или стимулирования иммунитета организма; уменьшения или обращения вспять подавления иммунитета; уменьшения количества, удаления или эрадикации вредных клеток или веществ из организма; снижения

нагрузки заболевания (например, фиброзной и опухолевой нагрузки); предотвращения рецидива или обострения; продление рефрактерного периода и/или иного улучшения выживаемости. Термин включает терапевтическое лечение, профилактическое лечение и применения, при которых снижается риск развития у субъекта нарушения или другого фактора риска. Лечение не обязательно включает полное излечение нарушения и охватывает варианты осуществления, при которых уменьшаются симптомы или лежащие в их основе факторы риска. В контексте комбинированной терапии термин может также относиться к: i) способности второго терапевтического средства снижать эффективную дозу первого терапевтического средства для уменьшения побочных эффектов и увеличения переносимости; ii) способности второго терапевтического средства делать пациента более восприимчивым к первому терапевтическому средству; и/или iii) способности реализовывать дополнительную или синергетическую клиническую пользу.

[139] *Опухолеассоциированный макрофаг (TAM)*: TAM представляют собой поляризованные/активированные макрофаги с проопухолевыми фенотипами (M2-подобные макрофаги). TAM могут представлять собой или моноциты/макрофаги из костного мозга, рекрутированные в очаг опухоли, или тканевые резидентные макрофаги, которые происходят от эритромиелоидных предшественников. На дифференцировку моноцитов/макрофагов в TAM влияет ряд факторов, включая локальные химические сигналы, такие как цитокины, хемокины, факторы роста и другие молекулы, которые действуют как лиганды, а также межклеточные взаимодействия между присутствующими в нише (опухолевом микроокружении) моноцитами/макрофагами. Как правило, моноциты/макрофаги могут быть разделены на так называемые подтипы «M1» или «M2», причем последний ассоциируется с более проопухолевым фенотипом. В солидной опухоли вплоть до 50% массы опухоли может приходиться на макрофаги, которые, предпочтительно, M2-поляризованы. Среди опухолеассоциированных моноцитов и популяций миелоидных клеток M1-макрофаги обычно экспрессируют поверхностноклеточные HLA-DR, CD68 и CD86, тогда как M2-макрофаги обычно экспрессируют поверхностноклеточные HLA-DR, CD68, CD163 и CD206. Опухолеассоциированные M2-подобные макрофаги (например, подтипы M2c и M2d) могут экспрессировать поверхностноклеточные LRRC33 и/или LRRC33-proTGFβ1. Также M2-подобными макрофагами может быть обогащено фиброзное микроокружение.

[140] *Опухолевое микроокружение*: Термин «опухолевое микроокружение (TME)» относится к локальной нише заболевания в ткани, в которой *in vivo* находится опухоль (например, солидная опухоль). TME может содержать ассоциированную с заболеванием молекулярную сигнатуру (набор хемокинов, цитокинов и так далее), ассоциированные с

заболеванием популяции клеток (такие как TAM, CAF, MDSC и так далее), а также ассоциированное с заболеванием окружение ECM (изменения компонентов и/или структуры ECM).

[141] *Вариабельный участок*: Термин «вариабельный участок» или «вариабельный домен» относится к части легкой и/или тяжелой цепи антитела, обычно включающей приблизительно 120-130 аминоконцевых аминокислот в тяжелой цепи и приблизительно 100-110 аминоконцевых аминокислот в легкой цепи. Согласно конкретным вариантам осуществления вариабельные участки различных антител сильно различаются по аминокислотной последовательности даже среди антител одного и того же вида. Вариабельный участок антитела обычно определяет специфичность конкретного антитела в отношении его мишени.

[142] За исключением рабочих примеров, и где не указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов или условия реакции, используемые в настоящем документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «приблизительно». Термин «приблизительно» при использовании вместе с процентами может означать ±1%.

[143] Единственное число при использовании в настоящем документе в описании и формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как означающее «по меньшей мере один».

[144] Фразу «и/или» при использовании в настоящем документе в описании и формуле изобретения следует понимать как означающую «любой или оба» из соединенных таким образом элементов, то есть элементов, которые в некоторых случаях присутствуют совместно, а в других случаях присутствуют порознь. Необязательно, могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно указанных выражением «и/или», независимо от того, связаны они или не связаны с конкретно указанными элементами, если явно не указано иное. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, ссылка на «A и/или B» при использовании в сочетании с неограничивающим выражением, таким как «содержащий», может относиться согласно одному варианту осуществления к A без B (необязательно, включая элементы, отличные от B); согласно другому варианту осуществления на B без A (необязательно, включая элементы, отличные от A); согласно еще одному варианту осуществления к A и B вместе (необязательно, включая другие элементы); и так далее.

[145] При использовании в настоящем документе в описании и формуле изобретения фразу «по меньшей мере один» в отношении перечня из одного или нескольких элементов следует понимать как означающую по меньшей мере один элемент, выбранный из любого

одного или нескольких из элементов в перечне элементов, но не обязательно включая по меньшей мере один из всех без исключения элементов, конкретно перечисленных в перечне элементов, и не исключая любые комбинации элементов в перечне элементов. Это определение также допускает, что, необязательно, могут присутствовать элементы, отличные от элементов, конкретно указанных в перечне элементов, к которым относится фраза «по меньшей мере один», независимо от того, связаны они или не связаны с конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, «по меньшей мере один из A и B» (или, эквивалентно, «по меньшей мере один из A или B» или, эквивалентно, «по меньшей мере один из A и/или B») может относиться, согласно одному варианту осуществления, к по меньшей мере одному, необязательно включая более чем один, A при отсутствии B (и, необязательно, включая элементы, отличные от B); согласно другому варианту осуществления к по меньшей мере одному, необязательно включая более чем один, B при отсутствии A (и, необязательно, включая элементы, отличные от A); согласно еще одному варианту осуществления к по меньшей мере одному, необязательно включая более чем один, A и по меньшей мере одному, необязательно включая более чем один, B (и необязательно включая другие элементы); и так далее.

[146] Использование порядковых терминов, таких как «первый», «второй», «третий» и так далее, в формуле изобретения для изменения элемента формулы изобретения само по себе не означает какого-либо приоритета, предшествования или порядка одного элемента формулы изобретения над другим или временного порядка, в котором выполняют действия способа, но их используют просто как метки для различения одного элемента формулы с определенным названием от другого элемента с тем же названием (но с использованием порядкового термина) для различения элементов формулы изобретения.

[147] Приводимые в настоящем документе диапазоны следует понимать как сокращение для всех значений в пределах диапазона. Например, диапазон от 1 до 50 следует понимать как включающий любое число, комбинацию 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 так далее.

Трансформирующий фактор роста бета (TGFβ)

[148] Активность трансформирующего фактора роста бета (TGFβ) и последующая частичная очистка растворимых факторов роста были впервые описаны в конце 1970-х - начале 1980-х, с чего около 40 лет назад началась область TGFβ. На сегодняшний день

идентифицировано 33 генных продукта, которые составляют большое суперсемейство TGFβ. Суперсемейство TGFβ можно разделить по крайней мере на три подкласса по структурному сходству: TGFβ, факторы роста и дифференцировки (GDF) и костно-морфогенетические белки (BMP). Подкласс TGFβ состоит из трех высококонсервативных изоформ, а именно TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3, которые у человека кодируются тремя отдельными генами.

[149] Считается, что TGFβ играют ключевую роль в различных процессах, таких как ингибирование пролиферации клеток, ремоделирование внеклеточного матрикса (ECM) и иммунный гомеостаз. Важность TGFβ1 для гомеостаза Т-клеток демонстрирует наблюдение, что мыши TGFβ1-/- выживают только 3-4 недели, погибая от полиорганной недостаточности из-за массивной иммунной активации (Kulkarni, A.B., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(2): p. 770-4; Shull, M.M., *et al.*, *Nature*, 1992. 359(6397): p. 693-9). Роль TGFβ2 и TGFβ3 менее ясна. Хотя три изоформы TGFβ имеют различные временные и пространственные паттерны экспрессии, они передают сигналы через одни и те же рецепторы, TGFβRI и TGFβRII, хотя в некоторых случаях, например для сигнализации TGFβ2, 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, J., *Annu Rev Biochem*, 1998. 67: p. 753-91). Лиганд-индуцированная олигомеризация TGFβRI/II запускает фосфорилирование факторов транскрипции SMAD, что приводит к транскрипции генов-мишеней, таких как Col1a1, Col3a1, ACTA2 и SERPINE1 (Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton, *Genes Dev*, 2005. 19(23): p. 2783-810). Также были описаны SMAD-независимые пути сигнализации TGFβ, например при раке или поражении аорты у мышей Марфана (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).

[150] Биологическая важность пути TGFβ у человека была подтверждена генетическими заболеваниями. Болезнь Камурати-Энгельмана приводит к дисплазии костей из-за аутосомно-доминантной мутации в гене TGFB1, что приводит к конститутивной активации сигнализации TGFβ1 (Janssens, K., *et al.*, *J Med Genet,* 2006. 43(1): p. 1-11). Пациенты с синдромом Лоеса-Дитца несут аутосомно-доминантные мутации в компонентах сигнального пути TGFβ, которые вызывают аневризму аорты, гипертелоризм и расщепление язычка (Van Laer, L., H. Dietz, and B. Loeys, *Adv Exp Med Biol*, 2014. 802: p. 95-105). Поскольку дисрегуляция пути TGFβ связана с множеством заболеваний, было разработано и испытано на пациентах несколько лекарственных средств, воздействующих на путь TGFβ, но с ограниченным успехом.

[151] Дисрегуляция сигнализации TGFβ связана с широким спектром заболеваний человека. Действительно, при ряде болезненных состояний такая дисрегуляция может включать несколько аспектов функции TGFβ. Пораженные ткани, такие как фиброзные и/или воспаленные ткани и опухоли, могут создавать локальную среду, в которой активация TGFβ может вызывать обострение или прогрессирование заболевания, что может быть по меньшей мере частично опосредовано взаимодействиями между множеством TGFβ-чувствительных клеток, которые активируются аутокринным и/или паракринным образом вместе с рядом других цитокинов, хемокинов и факторов роста, которые играют роль в условиях конкретного заболевания.

[152] Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие. Примеры относятся к следующим фигурам: **фиг. 1 – фиг. 31**.

Новые высокоэффективные селективные ингибиторы TGFβ1

[153] Настоящее изобретение относится к новым моноклональным антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, способным к связыванию с каждым из четырех известных человеческих LLC (hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1) с высокой аффинностью (например, K_D ниже 1 нМ) и с низкой скоростью диссоциации (то есть низкими значениями k_{OFF}), измеренной, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Новые антитела и фрагменты являются изоформно-селективными ингибиторами TGFβ1. Такое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 и L-CFR3, причем H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276); H-CDR2 содержит последовательность, представленную формулой ISGSGX$_1$AT, где, необязательно, X_1 представляет собой A или K (SEQ ID NO: 277); H-CDR3 содержит последовательность, представленную формулой VSSGX$_1$WDX$_2$D, где, необязательно, X_1 представляет собой H, D или Q и где, также необязательно, X_2 представляет собой F или Y (SEQ ID NO: 278); L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279); L-CDR2 содержит последовательность, представленную формулой AASX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$, где, необязательно, X_1 представляет собой N, G или V; где, также необязательно, X_2 представляет собой L, N или E; где, также необязательно, X_3 представляет собой Q или E; и где, также необязательно, X_4 представляет собой S или T (SEQ ID NO: 280); и L-CDR3 содержит последовательность, представленную формулой QQTYX$_1$VPLT, где, необязательно, X_1 представляет собой T или G (SEQ ID NO: 281). Согласно предпочтительным вариантам осуществления H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282); H-CDR3 содержит VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287); L-

CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывает эпитоп, который содержит один или несколько из следующих аминокислотных остатков последовательности полипептида proTGFβ1: S35, G37, E38, V39, P40, P41, G42, P43, R274, K280, H283 и K309. Согласно некоторым вариантам осуществления H-CDR1 может содержать последовательность GFTFADYA (SEQ ID NO: 276); H-CDR2 может содержать последовательность ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282); H-CDR3 может содержать последовательность, представленную формулой $VSSGX_1WDX_2D$, где, необязательно, X_1 представляет собой H или Q и где, также необязательно, X_2 представляет собой Y или F (SEQ ID NO: 283); L-CDR1 может содержать последовательность QSISSY (SEQ ID NO: 279); L-CDR2 может содержать последовательность AASGLES (SEQ ID NO: 284); и L-CDR3 может содержать последовательность QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285). Согласно предпочтительным вариантам осуществления H-CDR3 представляет собой VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывает эпитоп, который содержит один или несколько из следующих аминокислотных остатков последовательности полипептида proTGFβ1: S35, G37, E38, V39, P40, P41, G42, P43, R274, K280, H283 и K309.

[154] В приведенной ниже таблице представлены последовательности CDR применимых вариантов.

Таблица 1: Последовательности CDR приведенных в качестве примеров антител

H-CDR1	**H-CDR2**	**H-CDR3**	**L-CDR1**	**L-CDR2**	**L-CDR3**
GFTFADYA (SEQ ID NO: 276)	**ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282)**	**$VSSGX_1WDX_2D$ X_1 = H или Q X_2 = Y или F (SEQ ID NO: 283)**	**QSISSY (SEQ ID NO: 279)**	**AASGLES (SEQ ID NO: 284)**	**QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285)**

[155] Необязательно, один или несколько из шести CDR может включать одну или несколько (например, 1 или 2) замен аминокислот.

[156] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, выбранные для применения или производства в соответствии с настоящим изобретением, содержат H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 и L-CFR3, причем H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276); H-CDR2 содержит последовательность, представленную формулой $ISGSGX_1AT$, где, необязательно, X_1 представляет собой A или K (SEQ ID NO: 277); H-CDR3 содержит последовательность,

представленную формулой VSSGX$_1$WDX$_2$D, где, необязательно, X$_1$ представляет собой H, D или Q, и где, также необязательно, X$_2$ представляет собой F или Y (SEQ ID NO: 278); L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279); L-CDR2 содержит последовательность, представленную формулой AASX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$, где, необязательно, X$_1$ представляет собой N, G или V; где, также необязательно, X$_2$ представляет собой L, N или E; где, также необязательно, X$_3$ представляет собой Q или E; и где, также необязательно, X$_4$ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 280); и L-CDR3 содержит последовательность, представленную формулой QQTYX$_1$VPLT, где, необязательно, X$_1$ представляет собой T или G (SEQ ID NO: 281). Согласно предпочтительным вариантам осуществления H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282); H-CDR3 содержит VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287); L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывает эпитоп, который содержит один или несколько из следующих аминокислотных остатков последовательности полипептида proTGFβ1: S35, G37, E38, V39, P40, P41, G42, P43, R274, K280, H283 и K309.

[157] В приведенной ниже таблице дополнительно представлены последовательности CDR применимых вариантов.

Таблица 2: ВариантыCDR

H-CDR1	**H-CDR2**	**H-CDR3**	**L-CDR1**	**L-CDR2**	**L-CDR3**
GFTFADYA (SEQ ID NO: 276)	ISGSGX$_1$AT, где, необязательно, X$_1$ представляет собой A или K (SEQ ID NO: 277)	VSSGX$_1$WDX$_2$D, где, необязательно, X$_1$ представляет собой H, D или Q; и где, также необязательно, X$_2$ представляет собой F или Y (SEQ ID NO: 278)	QSISSY (SEQ ID NO: 279)	AASX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$, где, необязательно, X$_1$ представляет собой N, G или V; где, также необязательно, X$_2$ представляет собой L, N или E; где, также необязательно, X$_3$ представляет собой Q или E; и где, также необязательно, X$_4$ представляет собой S или T (SEQ ID NO: 280)	QQTYX$_1$VPLT, где, необязательно, X$_1$ представляет собой T или G (SEQ ID NO: 281)

[158] Согласно некоторым вариантам осуществления один или несколько из шести CDR могут включать одну или несколько (например, 1 или 2) замен аминокислот.

[159] Неограничивающие примеры предпочтительных ингибиторов активации TGFβ1 приведены в таблице ниже и обозначаются в настоящем документе как: Ab37, Ab38, Ab39, Ab40, Ab41, Ab42, Ab43, Ab44, Ab45, Ab46, Ab47, Ab48, Ab49, Ab50, Ab51 и Ab52. Каждое из этих антител может быть в форме цельного иммуноглобулина (такого как IgG) или его антигенсвязывающего фрагмента, такого как Fab-фрагмент. Антигенсвязывающий фрагмент можно применять для создания генноинженерной конструкции, которая содержит фрагмент или его производное, такой как биспецифические антитела и другие слитые белки, которые действуют как ингибитор TGFβ1. Шесть CDR каждого из приведенных в качестве примеров антител приведены в таблице ниже.

Таблица 3: Примеры последовательностей CDR

	H-CDR1	**SEQ ID NO:**	**H-CDR2**	**SEQ ID NO:**	**H-CDR3**	**SEQ ID NO:**	**L-CDR1**	**SEQ ID NO:**	**L-CDR2**	**SEQ ID NO:**	**L-CDR3**	**SEQ ID NO:**
Ab37	GFTFADYA	276	ISGSGAAT	282	VSSGHWDFD	289	QSISSY	279	AASNLES	292	QQTYTVPLT	296
Ab38	GFTFADYA	276	ISGSGAAT	282	VSSGHWDFD	289	QSISSY	279	AASGLES	284	QQTYTVPLT	296
Ab39	GFTFADYA	276	ISGSGAAT	282	VSSGHWDFD	289	QSISSY	279	AASVNES	293	QQTYTVPLT	296
Ab40	GFTFADYA	276	ISGSGAAT	282	VSSGHWDFD	289	QSISSY	279	AASNEET	294	QQTYTVPLT	296
Ab41	GFTFADYA	276	ISGSGAAT	282	VSSGHWDFD	289	QSISSY	279	AASNLES	292	QQTYGVPLT	285
Ab42	**GFTFADYA**	276	**ISGSGAAT**	282	**VSSGHWDFD**	289	**QSISSY**	279	**AASGLES**	284	**QQTYGVPLT**	285
Ab43	GFTFADYA	276	ISGSGAAT	282	VSSGHWDYD	287	QSISSY	279	AASNLES	292	QQTYTVPLT	296
Ab44	GFTFADYA	276	ISGSGAAT	282	VSSGHWDYD	287	QSISSY	279	AASGLES	284	QQTYTVPLT	296
Ab45	GFTFADYA	276	ISGSGAAT	282	VSSGHWDYD	287	QSISSY	279	AASNLES	292	QQTYGVPLT	285
Ab46	**GFTFADYA**	276	**ISGSGAAT**	282	**VSSGHWDYD**	287	**QSISSY**	279	**AASGLES**	284	**QQTYGVPLT**	285
Ab47	GFTFADYA	276	ISGSGAAT	282	VSSGDWDYD	290	QSISSY	279	AASNLES	292	QQTYGVPLT	285
Ab48	GFTFADYA	276	ISGSGAAT	282	VSSGDWDYD	290	QSISSY	279	AASGLES	284	QQTYGVPLT	285
Ab49	GFTFA	276	ISGSGA	282	VSSGQW	291	QSISS	279	AASNL	292	QQTYGV	285

	DYA		AT		DYD		Y		ES		PLT	
Ab50	**GFTFA DYA**	276	**ISGSGA AT**	282	**VSSGQW DYD**	291	**QSISS Y**	279	**AASGL ES**	284	**QQTYGV PLT**	285
Ab51	GFTFA DYA	276	ISGSGK AT	288	VSSGDW DYD	290	QSISS Y	279	AASNL QS	295	QQTYTVP LT	296
Ab52	GFTFA DYA	276	ISGSGK AT	288	VSSGDW DYD	290	QSISS Y	279	AASGL ES	284	QQTYGV PLT	285

[160] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен (V_H) тяжелой цепи и вариабельный домен (V_L) легкой цепи, причем V_H содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся идентичностью последовательности по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и 100%) с EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGAAT YFADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSSGHWDYDYWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO: 297), и причем V_L содержит аминокислотную последовательность, характеризующаяся идентичностью последовательности по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и 100%) с DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASGLESGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYGVPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 298). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывает эпитоп, который содержит один или несколько из следующих аминокислотных остатков последовательности полипептида proTGFβ1: S35, G37, E38, V39, P40, P41, G42, P43, R274, K280, H283 и K309.

[161] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен (V_H) тяжелой цепи и вариабельный домен (V_L) легкой цепи, причем V_H содержит EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGAAT YFADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSSGHWDYDYWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO: 297) и причем V_L содержит DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASGLESGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYGVPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 298).

[162] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен (V_H) тяжелой цепи и вариабельный домен (V_L) легкой цепи, причем V_H содержит EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGAAT YFADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSSGHWDFDYWGQGTLV

TVSS (SEQ ID NO: 299) и причем V_L содержит DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQTYTVPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 300).

[163] Настоящее изобретение относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, которые кодируют любую из аминокислотных последовательностей, представленных выше. Настоящий документ охватывает векторы (например, ДНК-плазмиды, такие как векторы экспрессии млекопитающих и родственные препараты нуклеиновых кислот), содержащие такую последовательность нуклеиновой кислоты; клетки, трансфицированные такими вектором(ами); клеточную линию со стабильной экспрессией таких нуклеиновых кислот; клеточную культуру, содержащую такие клетки, причем, необязательно, клеточная культура содержит клетки млекопитающего, способные к крупномасштабной продукции антитела, или белковую конструкцию, содержащую антигенсвязывающий фрагмент антитела.

[164] Согласно некоторым вариантам осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые селективно ингибируют активацию TGFβ1, содержат определяющий комплементарность участок 1 (CDRH1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности GFTFADYA (SEQ ID NO: 276); определяющий комплементарность участок 2 (CDRH2) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282); определяющий комплементарность участок 3 (CDRH3) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287); определяющий комплементарность участок 1 (CDRL1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности QSISSY (SEQ ID NO: 279); определяющий комплементарность участок 2 (CDRL2) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности AASGLES (SEQ ID NO: 284); и определяющий комплементарность участок 3 (CDRL3) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

[165] Согласно некоторым вариантам осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые селективно ингибируют активацию TGFβ1, содержат определяющий комплементарность участок 1 (CDRH1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 96% идентичную последовательности GFTFADYA (SEQ ID NO: 276); определяющий комплементарность

участок 2 (CDRH2) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 96% идентичную последовательности ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282); определяющий комплементарность участок 3 (CDRH3) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 96% идентичную последовательности VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287); определяющий комплементарность участок 1 (CDRL1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 96% идентичную последовательности QSISSY (SEQ ID NO: 279); определяющий комплементарность участок 2 (CDRL2) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 96% идентичную последовательности AASGLES (SEQ ID NO: 284); и определяющий комплементарность участок 3 (CDRL3) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 96% идентичную последовательности QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

[166] Согласно некоторым вариантам осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые селективно ингибируют активацию TGFβ1, содержат определяющий комплементарность участок 1 (CDRH1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную последовательности GFTFADYA (SEQ ID NO: 276); определяющий комплементарность участок 2 (CDRH2) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную последовательности ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282); определяющий комплементарность участок 3 (CDRH3) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную последовательности VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287); определяющий комплементарность участок 1 (CDRL1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную последовательности QSISSY (SEQ ID NO: 279); определяющий комплементарность участок 2 (CDRL2) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную последовательности AASGLES (SEQ ID NO: 284); и определяющий комплементарность участок 3 (CDRL3) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную последовательности QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

[167] Согласно некоторым вариантам осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые селективно ингибируют активацию TGFβ1, содержат определяющий комплементарность участок 1 (CDRH1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности GFTFADYA (SEQ ID NO: 276); определяющий комплементарность участок 2 (CDRH2) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по

меньшей мере на 99% идентичную последовательности ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282); определяющий комплементарность участок 3 (CDRH3) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287); определяющий комплементарность участок 1 (CDRL1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности QSISSY (SEQ ID NO: 279); определяющий комплементарность участок 2 (CDRL2) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности AASGLES (SEQ ID NO: 284); и определяющий комплементарность участок 3 (CDRL3) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

[168] Согласно некоторым вариантам осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые селективно ингибируют активацию TGFβ1, содержат определяющий комплементарность участок 1 (CDRH1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GFTFADYA (SEQ ID NO: 276); определяющий комплементарность участок 2 (CDRH2) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282); определяющий комплементарность участок 3 (CDRH3) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287); определяющий комплементарность участок 1 (CDRL1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QSISSY (SEQ ID NO: 279); определяющий комплементарность участок 2 (CDRL2) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AASGLES (SEQ ID NO: 284); и определяющий комплементарность участок 3 (CDRL3) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285). Согласно одному варианту осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный домен (V_H) тяжелой цепи, содержащий последовательность, характеризующуюся по меньшей мере идентичностью 95%, идентичностью 96%, идентичностью 97%, идентичностью 98%, идентичностью 99%, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:297; и вариабельный домен (V_L) легкой цепи, содержащий последовательность, характеризующуюся по меньшей мере идентичностью 95%, идентичностью 96%, идентичностью 97%, идентичностью 98%, идентичностью 99%, содержащую или состоящую из SEQ ID NO:298.

Кинетика связывания новых антител

[169] Новые антитела и их антигенсвязывающие фрагменты (например, Fab), раскрытые в настоящем документе, характеризуются улучшенными свойствами

связывания. Антитела и фрагменты способны специфически связываться с каждым из комплексов презентирующая молекула-proTGFβ1 (иногда называемых «большой латентный комплекс» или LLC, который представляет собой тройной комплекс, состоящий из димера proTGFβ1, связанного с одной презентирующей молекулой), а именно LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1. Рекомбинантно получаемые очищенные белковые комплексы можно применять в качестве антигенов (например, антигенных комплексов) для скрининга, оценки или подтверждения способности антитела связывать антигенные комплексы в подходящих анализах связывания *in vitro*. Такие анализы хорошо известны в данной области техники и включают, но без ограничения, анализы на основе интерферометрии биослоев (BLI) (такие как OCTET®) и анализы на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (такие как BIACORE®).

[170] Ранее были идентифицированы антитела и фрагменты, которые проявляли высокую аффинность (например, субнаномолярную K_D) к LLC. Теперь, преимущественно, были специально отобраны антитела и фрагменты с особенно низкой скоростью диссоциации с целью достижения особенно продолжительного ингибирующего действия.

[171] Соответственно, выбор подходящих ингибиторов TGFβ для осуществления способов и терапевтического применения согласно настоящему изобретению может включать проведение анализов связывания *in vitro* для измерения кинетики связывания. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывает каждый из следующих больших латентных комплексов с субнаномолярной аффинностью, например с K_D 1,0 нМ или менее и с k_{OFF} 10E-4 (1/с) или ниже: hLTBP1-proTc, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1. Предпочтительно, антитело или фрагмент также связывает каждый из мышиных аналогов LLC, а именно mLTBP1-proTGFβ1, mLTBP3-proTGFβ1, mGARP-proTGFβ1 и mLRRC33-proTGFβ1, с такой же аффинностью, что и человеческие LLC. Кинетику связывания *in vitro* можно легко определить путем измерения взаимодействий исследуемых антител (таких как антигенсвязывающие фрагменты) и подходящего антигена, такого как большие латентные комплексы (LLC) и малые латентные комплексы (SLC). Подходящие способы анализа связывания *in vitro* для определения параметров кинетики связывания включают анализы на основе BLI, такие как OCTET®, и анализы на основе поверхностного плазмонного резонанса, такие как системы BIACORE®. Пример анализов связывания *in vitro* на основе Octet представлен на **фиг. 1**. Пример анализов связывания *in vitro* на основе SPR представлен на **фиг. 2**. В этом эксперименте использовали Fab-фрагменты Ab46 и эталонного антитела, которые оба являются ингибиторами активации TGFβ1. Как показано

на **фиг. 2**, два Fab характеризуются близкими скоростями «образования» (k_{ON}), что указывает на их взаимодействие (то есть связывание) с антигеном с близкими скоростями. Однако их скорости «распада» (k_{OFF}) заметно различаются, так что $t_{1/2}$ у Ab46 составляет более 130 минут, тогда как эталонное антитело характеризуется значением $t_{1/2}$ только 2,4 минуты, что показывает, что даже хотя фаза связывания/ассоциации взаимодействия происходит со схожей кинетикой, Ab46 способно оставаться связанным с антигеном в течение гораздо более длительного периода времени (например, больше $t_{1/2}$), чем эталонное антитело, которое «отпадает» (например, диссоциирует) от антигена относительно быстро. Таким образом, разница в кинетике диссоциации преимущественно обусловлена заметной разницей в их общей аффинности (K_D), что может приводить к повышению активности (смотри ниже). Таким образом, характеристика кинетики связывания дает полезную информацию о потенциальной продолжительности эффектов и результирующей активности *in vivo*.

[172] Соответственно, настоящее изобретение относится к способу выбора ингибитора активации TGFβ для терапевтического применения, причем данный способ предусматривает выбор антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который характеризуется скоростью диссоциации 10,0e-4 (c^{-1}) или менее, измеренной с помощью SPR. Согласно некоторым вариантам осуществления, антитело или фрагмент связывают антиген с аффинность менее 1 нМ (то есть с субнаномолярной), например менее 500 пМ, 400 пМ, 300 пМ, 200 пМ, 100 пМ или 50 пМ.

[173] В таблице ниже приведены примеры кинетики связывания перечисленных антител (например, Fab), полученные с помощью анализов связывания на основе OCTET®. Эксперименты проводили с иммобилизованным биотинилированным антигеном и Fab-фрагментами (например, исследуемыми антителами) в растворе.

Таблица 4: Кинетика связывания примеров антител по данным Octet

Ab	**hLTBP1-proTGFβ1**		**hLTBP3-proTGFβ1**		**hGARP-proTGFβ1**	
	K_{ON} (M^{-1}/c^{-1})	K_{OFF} (c^{-1})	K_{ON} (M^{-1}/c^{-1})	K_{OFF} (c^{-1})	K_{ON} (M^{-1}/c^{-1})	K_{OFF} (c^{-1})
Ref	**7,14E+05**	**3,47E-03**	**8,09E+05**	**4,63E-03**	**7,14E+06**	**2,24E-03**
Ab37	7,04E+05	2,21E-04	6,77E+05	8,81E-04	7,04E+05	3,11E-04
Ab38	7,45E+05	1,00E-05	6,74E+05	5,55E-04	7,45E+06	2,72E-04
Ab39	6,30E+05	2,86E-04	1,16E+06	1,89E-03	6,30E+05	9,61E-04
Ab40	6,80E+05	5,26E-04	7,01E+05	9,64E-04	6,80E+06	7,63E-04

Ab41	5,23E+05	1,79E-04	5,39E+05	4,35E-04	5,23E+05	3,48E-04
Ab42	**7,00E+05**	**2,21E-05**	**6,20E+05**	**2,96E-04**	**7,00E+05**	**3,01E-04**
Ab43	7,38E+05	4,57E-04	6,54E+05	6,36E-04	7,38E+06	4,92E-04
Ab44	6,78E+05	3,39E-04	7,04E+05	6,66E-04	6,78E+05	6,82E-04
Ab45	5,24E+05	2,26E-04	5,54E+05	5,21E-04	5,24E+05	2,44E-04
Ab46	**7,03E+05**	**4,98E-05**	**6,19E+05**	**4,38E-04**	**7,03E+05**	**2,90E-04**
Ab47	6,55E+05	1,13E-04	5,17E+05	5,78E-04	6,55E+05	8,63E-04
Ab48	4,37E+05	1,00E-05	6,71E+05	5,20E-05	4,37E+05	3,23E-04
Ab49	6,30E+05	2,00E-04	5,81E+05	8,13E-04	6,30E+05	6,43E-04
Ab50	**6,70E+05**	**5,55E-05**	**4,61E+05**	**4,48E-04**	**6,70E+05**	**3,21E-04**
Ab51	8,13E+05	1,92E-03	6,50E+05	2,50E-03	8,13E+06	1,37E-03
Ab52	6,65E+05	2,69E-04	5,70E+05	5,57E-04	6,65E+05	5,42E-04

[174] Из этих антител для дальнейшей оценки были выбраны Ab42, Ab46 и Ab50. Для измерения кинетики связывания использовали поверхностный плазмонный резонанс (SPR) с помощью системы BIACORE®. Были измерены кинетика ассоциации и диссоциации Fab-фрагментов Ab42, Ab46, Ab50 и эталонного антитела (обозначенного как «Ref») с антигенными комплексами, и ниже приведены итоговые равновесные константы диссоциации (KD). Эксперименты проводили с восемью типами LLC, а именно hLTBP1-proTGFβ1, mLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, mLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1, mGARP-proTGFβ1, hLRRC33-proTGFβ1 и mLRRC33-proTGFβ1.

Таблица 5: hLTBP1-proTGFβ1

Ab (Fab)	**K_{ON} (M^{-1}/c^{-1})**	**K_{OFF} (c^{-1})**	**K_D (M)**	**Разница, раз**
Ref	7,18E+05	4,83E-03	6,73E-9	
Ab42	1,54E+06	9,34E-05	6,06E-11	111
Ab46	1,75E+06	8,81E-05	5,02E-11	134
Ab50	1,55E+06	1,40E-04	9,03E-11	75

Таблица 6: mLTBP1-proTGFβ1

Ab (Fab)	**K_{ON} (M^{-1}/c^{-1})**	**K_{OFF}(c^{-1})**	**K_D (M)**	**Разница, раз**
Ref	8,53E+05	5,61E-03	6,58E-9	
Ab42	1,66E+06	1,01E-04	6,05E-11	109

Ab46	1,85E+06	9,87E-05	5,34E-11	123
Ab50	1,70E+06	1,77E-04	1,05E-10	63

Таблица 7: hLTBP3-proTGFβ1

Ab (Fab)	K_{ON} (M^{-1}/c^{-1})	K_{OFF} (c^{-1})	K_D (M)	Разница, раз
Ref	1,35E+06	1,24E-02	9,20E-9	
Ab42	8,44E+05	1,21E-04	1,44E-10	64
Ab46	1,00E+06	1,28E-04	1,27E-10	72
Ab50	9,05E+05	1,74E-04	1,93E-10	48

Таблица 8: mLTBP3-proTGFβ1

Ab (Fab)	K_{ON} (M^{-1}/c^{-1})	K_{OFF} (c^{-1})	K_D (M)	Разница, раз
Ref	4,66E+05	4,08E-03	8,74E-9	
Ab42	1,20E+06	1,17E-04	9,71E-11	90
Ab46	1,20E+06	1,15E-04	9,56E-11	91
Ab50	1,08E+06	1,73E-04	1,61E-10	54

Таблица 9: hGARP-proTGFβ1

Ab (Fab)	K_{ON} (M^{-1}/c^{-1})	K_{OFF} (c^{-1})	K_D (M)	Разница, раз
Ref	3,07E+05	3,77E-03	1,23E-8	
Ab42	8,46E+05	2,47E-04	2,91E-10	42
Ab46	9,65E+05	2,22E-04	2,30E-10	53
Ab50	8,76E+05	3,08E-04	3,51E-10	35

Таблица 10: mGARP-proTGFβ1

Ab (Fab)	K_{ON} (M^{-1}/c^{-1})	K_{OFF} (c^{-1})	K_D (M)	Разница, раз
Ref	2,76E+05	5,24E-03	1,90E-8	
Ab42	9,46E+05	3,46E-04	3,65E-10	52
Ab46	1,02E+06	2,78E-04	2,74E-10	69
Ab50	9,15E+05	4,21E-04	4,60E-10	41

Таблица 11: hLRRC33-proTGFβ1

Ab (Fab)	K_{ON} (M^{-1}/c^{-1})	K_{OFF} (c^{-1})	K_D (M)	Разница, раз
Ref	4,72E+05	4,70E-03	9,95E-9	
Ab42	10,00E+05	1,23E-04	1,23E-10	81
Ab46	1,52E+06	1,28E-04	8,41E-11	118
Ab50	9,47E+05	1,80E-04	1,90E-10	52

Таблица 12: mLRRC33-proTGFβ1

Ab (Fab)	K_{ON} (M^{-1}/c^{-1})	K_{OFF} (c^{-1})	K_D (M)	Разница, раз
Ref	5,77E+05	4,89E-03	8,48E-9	
Ab42	1,08E+06	1,23E-04	1,14E-10	74
Ab46	1,26E+06	1,12E-04	8,92E-11	95
Ab50	1,07E+06	1,87E-04	1,76E-10	48

Активность; ингибирующее действие

[175] Антитела, раскрытые в настоящем документе, можно в широком смысле охарактеризовать как «функциональные антитела» из-за их способности ингибировать сигнализацию TGFβ1. При использовании в настоящем документе «функциональное антитело» приобретают одну или несколько биологических активностей благодаря своей способности связывать антиген (например, антигенные комплексы). Поэтому функциональные антитела в широком смысле включают антитела, способные модулировать активность/функцию молекул-мишеней (то есть антигена). Такие модулирующие антитела включают *ингибирующие* антитела (или *ингибиторные* антитела) и *активирующие* антитела. Настоящее раскрытие относится к антителам, которые могут ингибировать биологический процесс, опосредованный сигнализацией TGFβ1, связанной с разными контекстами TGFβ1. Ингибирующие средства, используемые для осуществления настоящего изобретения, такие как антитела, описанные в настоящем документе, должны быть TGFβ1-селективными и не нацеливаться TGFβ2 и TGFβ3 или не взаимодействовать с ними при введении в терапевтически эффективной дозе (дозе, при которой достигается достаточная эффективность при приемлемом уровне токсичности). Новые антитела согласно настоящему изобретению характеризуются усиленным ингибирующим действием (активностью) по сравнению с ранее идентифицированными ингибиторами активации TGFβ1.

[176] Для определения относительной активности ингибирующих антител можно измерять фармакодинамические (PD) эффекты. Обычно используемые меры PD для

сигнального пути TGFβ включают без ограничения фосфорилирование SMAD2/3 и экспрессию нижележащих эффекторных генов, транскрипция которых чувствительна к активации TGFβ, таких как гены с чувствительным к TGFβ промоторным элементом (например, с SMAD-связывающими элементами). Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению способны полностью блокировать индуцированное заболеванием фосфорилирование SMAD2/3 в доклинических моделях фиброза, когда животным вводят дозу 3 мг/кг или меньше. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению способны снижать и/или полностью блокировать индуцированное заболеванием фосфорилирование SMAD2/3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению способны снижать и/или полностью блокировать индуцированное заболеванием фосфорилирование SMAD2 (например, независимо от любого изменения в SMAD3). Согласно некоторым вариантам осуществления снижение измеряют как отношение фосфорилированного SMAD2/3 к общему SMAD2/3. Согласно некоторым вариантам осуществления снижение измеряют как отношение фосфорилированного SMAD2 к общему SMAD2. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению способны уменьшать ядерную локализацию фосфорилированного SMAD2 по измерениям, например, с помощью IHC. Без ограничения теорией, согласно некоторым вариантам осуществления измерение фосфорилирования SMAD2 (без измерения SMAD3) может повышать точность определения эффекта, связанного с лечением. Denis *et al., Development* 143: 3481-90 (2016); Liu *et al., J. Biol. Chem.* 278: 11721-8 (2003); David *et al., Oncoimmunology* 6: e1349589 (2017). Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению способны значительно подавлять индуцированную фиброзом экспрессию панели маркерных генов, включая Acta2, Col1a1, Col3a1, Fn1, Itga11, Lox, Loxl2, при введении животным в дозе 10 мг/кг или менее в модели UUO фиброза почек.

[177] Согласно некоторым вариантам осуществления активность ингибирующего антитела можно измерять с помощью подходящих клеточных анализов, таких как анализы репортера CAGA, описанные в настоящем документе. Обычно культивируемые клетки, такие как гетерологичные клетки и первичные клетки, можно применять для проведения анализов клеточной активности. Можно использовать клетки, которые экспрессируют эндогенный TGFβ1 и/или представляющую интерес презентирующую молекулу, такую как LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33. В качестве альтернативы, в такие клетки можно вводить экзогенные нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющий интерес белок (белки), такой как TGFβ1, и/или представляющую интерес презентирующую молекулу, такую как

LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33, например путем трансфекции (например, стабильной трансфекции или временной трансфекции) или путем инфицирования с помощью вирусного вектора. Согласно некоторым вариантам осуществления для таких анализов используют клетки LN229. Клетки, экспрессирующие TGFβ1 и представляющую интерес презентирующую молекулу (например, LTBP1, LTBP3, GARP или LRRC33) выращивают в культуре, которая или «презентирует» большой латентный комплекс на клеточной поверхности (при ассоциации с GARP или LRRC33), или депонирует его в ECM (при ассоциации с LTBP). Активация TGFβ1 может быть запущена интегрином, экспрессируемым на поверхности других клеток. Экспрессирующие интегрин клетки могут представлять собой те же самые клетки, коэкспрессирующие большой латентный комплекс, или клетки другого типа. В систему анализа, которая включает TGFβ-чувствительный элемент, добавляют репортерные клетки. Таким образом, степень активации TGFβ может быть измерена путем детектирования сигнала от репортерных клеток (например, TGFβ-чувствительных репортерных генов, таких как люциферазный, связанных с TGFβ-чувствительным промоторным элементом) после активации TGFβ. Используя такие системы клеточного анализа, можно определять ингибирующее действие антител путем измерения изменения (уменьшения) или различия в репортерном сигнале (например, в активности люциферазы, измеренной по показаниям флуоресценции) в присутствии или в отсутствие исследуемых антител.

[178] Ниже приведены примеры результатов исследований клеточной активности. В этих исследованиях человеческие клетки LM229 использовали для измерения активности исследуемых антител в отношении их способности ингибировать TGFβ-сигнализацию. Эти клетки экспрессируют эндогенный LTBP-proTGFβ1. Анализы проводили с использованием i) моноклональных антител (иммуноглобулина hIgG4) и ii) Fab-фрагментов той же панели исследуемых антител, как показано.

Таблица 13: Активность in vitro полноразмерного IgG и Fab-фрагментов новых ингибиторов активации

Ab	**mAb IC50 (нМ)**	**fAb IC50 (нМ)**
Эталонное Ab	**1,201**	**4,967**
Ab37	7,825	1,006
Ab38	8,46	0,5946
Ab39	1,289	3,449
Ab40	0,6699	0,7588
Ab41	1,314; 1,007	2,018

Ab42	**1,169**	**1,113**
Ab43	1,267	0,9992
Ab44	1,483	2,633
Ab45	0,6719	0,5937
Ab46	**0,9501**	**0,7226**
Ab47	0,8328	0,5517
Ab48	0,8912	0,7448
Ab49	1,028	3,374
Ab50	**1,063**	**0,8716**
Ab51	1,252	2,051
Ab52	0,4739	0,9549

[179] Хотя было показано, что эталонное антитело, используемое в качестве точки сравнения («эталонное Ab»), характеризуется кинетикой ассоциации, аналогичной многим из исследованных новых антител, общая активность новых антител была заметно лучше, предположительно за счет более низкой скорости диссоциации по сравнению с эталонным антителом.

[180] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая активность (например, IC_{50}) новых антител согласно настоящему изобретению, рассчитанная на основе клеточных анализов (таких как анализы клеток LN229, описанные в другом месте настоящего документа), может составлять менее 10 нМ при измерении в отношении каждого из комплексов hLTBP1-proTGFβ1 и hLTBP3-proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела характеризуются IC50 5 нМ или менее (то есть ≤5 нМ) при измерении в отношении каждого из комплексов hLTBP1-proTGFβ1 и hLTBP3-proTGFβ1. Согласно предпочтительным вариантам осуществления IC50 антитела при измерении в отношении по меньшей мере одного из комплексов hLTBP1-proTGFβ1 и hLTBP3-proTGFβ1 составляет менее 1 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело характеризуется IC50 менее 1 нМ в отношении по меньшей мере одного из комплексов hLTBP1-proTGFβ1 и hLTBP3-proTGFβ1, а также по меньшей мере одного из комплексов mLTBP1-proTGFβ1 и mLTBP3-proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело согласно настоящему изобретению характеризуется IC50 10 нМ или менее (то есть ≤10 нМ) для каждого из комплексов hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело согласно настоящему изобретению характеризуется IC50 5 нМ

или менее (то есть ≤5 нМ) (например, 1 нМ или менее) для каждого из комплексов hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1.

[181] Согласно некоторым вариантам осуществления активность может быть оценена в подходящих моделях *in vivo* как мера эффективности и/или фармакодинамических эффектов. Например, если первое антитело эффективно в модели *in vivo* при определенной концентрации, а второе антитело так же эффективно при более низкой концентрации, чем первое в той же модели *in vivo*, то можно сказать, что второе антитело активнее, чем первое антитело. Для оценки относительной активности ингибиторов TGFβ1 можно применять любые подходящие модели заболеваний, известные в данной области техники, в зависимости от конкретного представляющего интерес показания, например модели рака и модели фиброза. Предпочтительно, в такие исследования включают несколько доз или концентраций каждого исследуемого антитела.

[182] Аналогично, для определения относительной активности ингибирующих антител можно измерять фармакодинамические (PD) эффекты. Обычно используемые меры PD для сигнального пути TGFβ включают без ограничения фосфорилирование SMAD2/3 и экспрессию нижележащих эффекторных генов, транскрипция которых чувствительна к активации TGFβ, таких как гены с чувствительным к TGFβ промоторным элементом (например, с SMAD-связывающими элементами). Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению способны полностью блокировать индуцированное заболеванием фосфорилирование SMAD2/3 в доклинических моделях фиброза, когда животным вводят дозу 3 мг/кг или меньше. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению способны значительно подавлять индуцированную фиброзом экспрессию панели маркерных генов, включая Acta2, Col1a1, Col3a1, Fn1, Itga11, Lox, Loxl2, при введении животным в дозе 10 мг/кг или менее в модели UUO фиброза почек.

Связывающие участки

[183] В контексте настоящего изобретения «связывающий участок» антигена обеспечивает структурную основу для взаимодействия антитело-антиген. При использовании в настоящем документе «связывающий участок» относится к области контакта между антителом и антигеном, так что при связывании с комплексом proTGFβ1 («антиген») в физиологическом растворе антитело или фрагмент защищают связывающий участок от воздействия растворителя, что определяют с помощью подходящих методов, таких как масс-спектрометрия с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS).

[184] В данной области техники хорошо известна HDX-MS, которая является широко используемым методом изучения белковой конформации или белок-белковых

взаимодействий в растворе. Этот способ основан на обмене атомов водорода в амиде белкового остова с дейтерием, присутствующим в растворе. Измеряя скорости обмена водорода и дейтерия, можно получать информацию о динамике и конформации белка (рассмотрено в документе Wei *et al.,* (2014) "Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics: methodology and applications." *Drug Disc Today*. 19(1): 95-102; который включен посредством ссылки). Применение этого метода основано на предположении, что при образовании комплекса антитело-антиген область контакта между партнерами по связыванию может перекрывать доступ растворителя, тем самым снижая или ограничивая скорость обмена из-за стерического исключения растворителя.

[185] Используя этот метод, можно определить связывающие (следовательно, защищенные) участки proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления часть proTGFβ1, идентифицированная как важная для связывания любого из Ab37, Ab38, Ab39, Ab40, Ab41, Ab42, Ab43, Ab44, Ab45, Ab46, Ab47, Ab48, Ab49, Ab50, Ab51, Ab52 и их вариантов (например, содержащих последовательность VH с идентичностью последовательности по меньшей мере 90% (например, с идентичностью последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) и последовательность VL с идентичностью последовательности по меньшей мере 90% (например, с идентичностью последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%)), включает по меньшей мере часть аминокислотного отрезка SPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNST (SEQ ID NO: 261) («первый связывающий участок»), который в значительной степени перекрывается с белковым доменом в LAP, обычно называемым *лассо латентности*. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает (следовательно, защищает) по меньшей мере части аминокислотной последовательности LREAVPE (SEQ ID NO: 259) («второй связывающий участок») в домене «рука» в LAP. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает (следовательно, защищает) по меньшей мере часть аминокислотной последовательности WKWIHEPKGYHANFCLG (SEQ ID NO: 262) («третий связывающий участок»), который в значительной степени перекрывается с так называемым «пальцем-1» (Finger-1) в домене фактора роста. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывается с эпитопом комплекса proTGFβ1, содержащим один или несколько аминокислотных остатков из SPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNST (SEQ ID NO: 261) («первый связывающий участок»), LREAVPE (SEQ ID NO: 259) («второй связывающий участок») и/или один или несколько аминокислотных остатков из WKWIHEPKGYHANFCLG (SEQ ID NO: 262) («третий связывающий участок»).

[186] Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительный остаток (остатки), например остатки за пределами трех идентифицированных связывающих участков, защищенных HD-X, могут дополнительно способствовать достижению усиленного связывания антитело-антиген новых антител, раскрытых в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления остаток лизина (Lys) в положении 309 (то есть K309) в домене фактора роста последовательности полипептида proTGFβ1 может быть вовлечен в опосредование сильного взаимодействия с одним или несколькими из Ab37, Ab38, Ab39, Ab40, Ab41, Ab42, Ab43, Ab44, Ab45, Ab46, Ab47, Ab48, Ab49, Ab50, Ab51, Ab52 и их вариантов (например, содержащих последовательность V_H с идентичностью последовательности по меньшей мере 90% (например, с идентичностью последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) и последовательность V_L с идентичностью последовательности по меньшей мере 90% (например, с идентичностью последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%)). Согласно некоторым вариантам осуществления остаток пролина (Pro) в положении 43 (то есть P43) в продомене последовательности полипептида proTGFβ1 может быть вовлечен в опосредование сильного взаимодействия с одним или несколькими из Ab37, Ab38, Ab39, Ab40, Ab41, Ab42, Ab43, Ab44, Ab45, Ab46, Ab47, Ab48, Ab49, Ab50, Ab51, Ab52 и их вариантов (например, содержащих последовательность V_H с идентичностью последовательности по меньшей мере 90% (например, с идентичностью последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) и последовательность V_L с идентичностью последовательности по меньшей мере 90% (например, с идентичностью последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%)). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывают эпитоп, который содержит один или несколько из следующих аминокислотных остатков последовательности полипептида proTGFβ1: S35, G37, E38, V39, P40, P41, G42, P43, R274, K280, H283 и K309. Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп представляет собой комбинаторный эпитоп (смотри ниже), который содержит P43 и K309.

[187] Согласно некоторым вариантам осуществления первый связывающий участок и/или второй связывающий участок придают изоформную селективность антителу или фрагменту.

[188] Преимущественно, предпочтительные ингибирующие антитела согласно настоящему изобретению способны ингибировать высвобождение зрелого фактора роста из латентного комплекса, тем самым снижая сигнализацию факторов роста. Такие антитела могут нацеливаться на любой эпитоп, что приводит к снижению высвобождения или

активности фактора роста при связывании с такими антителами. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению специфически связывают комбинаторный эпитоп, то есть эпитоп, образованный двумя или более компонентами/частями антигена или антигенного комплекса. Например, комбинаторный эпитоп может быть образован при участии нескольких частей одного белка, то есть аминокислотных остатков из более чем одного несмежного сегмента одного и того же белка. В качестве альтернативы, комбинаторный эпитоп может быть образован при участии нескольких белковых компонентов антигенного комплекса. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению специфически связывают конформационный эпитоп (или конформационно-специфический эпитоп), например эпитоп, который чувствителен к трехмерной структуре (то есть конформации) антигена или антигенного комплекса. Согласно предпочтительным вариантам осуществления комбинаторный эпитоп содержит аминокислотный остаток в лассо латентности и аминокислотный остаток в домене фактора роста.

Таблица 14: Выбранные белковые домены/модули человеческого полипептида TGFβ1

Домен/модуль *человеческого TGFβ1*	**Аминокислотная последовательность**	**SEQ ID NO**
Ассоциированный с латентностью пептид (LAP) (продомен)	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLM VETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAEL RLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEW LSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDI NGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHR R (*Подчеркнут* «*первый связывающий участок», определенный с помощью HD-X*)	263
«Смирительная рубашка»	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LP	264
Домен фактора роста	ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYH ANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQ ALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	265
«Застежка» («Fastener»)	остатки 74-76, YYA	н/д

Сайт расщепления фурином	RHRR	266
«Рука»	EAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMV ETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELR LLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWL SFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDIN GFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRR (*Подчеркнут* «в*торой связывающий участок», определенный с помощью HD-X*)	267
«Палец-1»	CVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFC (*Подчеркнут* «третий *связывающий участок», определенный с помощью HD-X*)	268
«Палец-2»	CVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	269
Остаток для связывания с презентирующей молекулой	Cys 4	н/д
Лассо латентности	LASPPSQGEVPPGPL	270
Расширенное лассо латентности	LASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTR	271
Спираль альфа-1	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLR	272
Спираль альфа-2	AVLALYNSTR	273
Петля инициации	NGFTTGRRGDLATIHGMNRP	274
Связывание интегрина	остатки 215-217, RGD	н/д
«Бабочка» («Bowtie»)	CSCDSRDNTLQVD	275

Антигенные комплексы и компоненты

[189] Новые антитела согласно настоящему изобретению специфически связывают каждый из четырех известных человеческих больших латентных комплексов (например, hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1) с низкой скоростью диссоциации, селективно ингибируют активацию TGFβ1 и удовлетворяют критериям безопасности, рассмотренным в настоящем документе. Скрининг (например, идентификация и выбор) таких антител включает использование подходящих антигенных комплексов, которые обычно получают рекомбинантным путем. Предлагаются применимые белковые компоненты, которые могут содержать такие антигенные комплексы, включая изоформы TGFβ и родственные полипептиды, фрагменты и варианты, презентирующие молекулы (например, LTBP, GARP, LRRC33) и родственные полипептиды, фрагменты и варианты. Эти компоненты можно экспрессировать, очищать и позволять им формировать белковый комплекс (такой как большие латентные комплексы), который можно применять в процессе скрининга антител. Скрининг может включать положительный отбор, при котором желательные связывающие вещества выбирают из пула или библиотеки связывающих веществ и несвязывающих веществ, и отрицательный отбор, при котором нежелательные связывающие вещества удаляют из пула.

[190] Согласно некоторым вариантам осуществления TGFβ1 содержит природную аминокислотную последовательность млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления TGFβ1 содержит природную человеческую аминокислотную последовательность. Согласно некоторым вариантам осуществления TGFβ1 содержит аминокислотную последовательность человека, обезьяны, крысы или мыши. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, не связываются специфически с TGFβ2. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, не связываются специфически с TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, не связываются специфически с TGFβ2 или TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, не связываются специфически с TGFβ2 и TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, специфически связываются с TGFβ1, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24. Аминокислотные последовательности TGFβ2 и TGFβ3 изложены под SEQ ID NO: 28 и 32 соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая

часть, описанные в настоящем документе, специфически связываются с TGFβ1, содержащим неприродную аминокислотную последовательность (иначе называемым в настоящем документе неприродным TGFβ1). Например, неприродный TGFβ1 может содержать одну или несколько введенных рекомбинантно мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью природного TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная последовательность TGFβ1, TGFβ2 или TGFβ3 содержит аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 24-35, как показано в таблице 10. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная последовательность TGFβ1, TGFβ2 или TGFβ3 содержит аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 36-43, как показано в таблице 11.

[191] TGFβ1 (продомен + домен фактора роста) LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAG ESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLL SRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWL SRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERA QHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPC PYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVR SCKCS (SEQ ID NO: 24)

[192] TGFβ2 (продомен + домен фактора роста) SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEK ASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNA SNLVKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSF DVTDAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELEARFAGIDGTSTYTS GDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQDNCCL RPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASP CCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS (SEQ ID NO: 28)

[193] TGFβ3 (продомен + домен фактора роста) SLSLSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLE EMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVE KNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWL SFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHG RGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCCVR PLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPC CVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS (SEQ ID NO: 32)

Таблица 15: Примеры аминокислотных последовательностей TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3

Белок	**Последовательность**	**SEQ ID NO**
proTGFβ1	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGE VPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYY AKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELR EAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNN SWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGE IEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATI HGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCF SSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFC LGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVP QALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	24
proTGFβ1 C4S	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGE VPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYY AKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELR EAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNN SWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGE IEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATI HGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCF SSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFC LGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVP QALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	25
proTGFβ1 D2G	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGE VPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYY AKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELR EAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNN SWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGE IEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATI HGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHGALDTNYCFS STEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCL GPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQ ALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	26
proTGFβ1 C4S	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGE	27

D2G	VPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYY AKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELR EAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNN SWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGE IEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATI HGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHGALDTNYCFS STEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCL GPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQ ALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	
proTGFβ2	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDY PEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSD EEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFD VSAMEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIELY QILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDA VHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKS EELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPH LLLMLLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQD NCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACP YLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPL TILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS	28
proTGFβ2 C5S	SLSTSSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDY PEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSD EEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFD VSAMEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIELY QILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDA VHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKS EELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPH LLLMLLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQD NCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACP YLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPL TILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS	29
proTGFβ2 C5S D2G	SLSTSSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDY PEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSD EEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFD VSAMEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIELY	30

	QILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDA VHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKS EELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPH LLLMLLPSYRLESQQTNRRKGALDAAYCFRNVQDN CCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPY LWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTI LYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS	
proTGFβ2 D2G	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDY PEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSD EEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFD VSAMEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIELY QILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDA VHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKS EELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPH LLLMLLPSYRLESQQTNRRKGALDAAYCFRNVQDN CCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPY LWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTI LYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS	31
proTGFβ3	SLSLSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEP TVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQEN TESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVF RFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIE LFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTD TVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHE VMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLI LMMIPPHRLDNPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLEEN CCVRPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCP YLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPL TILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	32
proTGFβ3 C7S	SLSLSTSTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEP TVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQEN TESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVF RFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIE LFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTD TVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHE	33

	VMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLI LMMIPPHRLDNPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLEEN CCVRPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCP YLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPL TILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	
proTGFβ3 C7S D2G	SLSLSTSTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEP TVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQEN TESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVF RFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIE LFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTD TVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHE VMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLI LMMIPPHRLDNPGQGGQRKGALDTNYCFRNLEENC CVRPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCPY LRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTI LYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	34
proTGFβ3 D2G	SLSLSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEP TVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQEN TESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVF RFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIE LFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTD TVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHE VMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLI LMMIPPHRLDNPGQGGQRKGALDTNYCFRNLEENC CVRPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCPY LRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTI LYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	35

Таблица 16: Примеры аминокислотных последовательностей отличных от человека видов

Белок	**Вид**	**Последовательность**	**SEQ ID NO**
proTGFβ1	Мышь	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNT	36

		SDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQK YSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQW LNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKR RGDLGTIHDMNRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHRR ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHE PKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIV RSCKCS	
proTGFβ1	Яванский макак	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNT SELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWL SRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNTLQVDINGFTTGRR GDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRA LDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPG ASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVR SCKCS	37
TGFβ1 LAP C4S	Мышь	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNT SDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQK YSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQW LNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKR RGDLGTIHDMNRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHRR	38
TGFβ1 LAP C4S	Яванский макак	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNT SELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWL SRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNTLQVDINGFTTGRR GDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRR	39
proTGFβ1 C4S D2G	Мышь	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEAD	40

		YYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNT SDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQK YSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQW LNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKR RGDLGTIHDMNRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHGA LDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPG ASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVR SCKCS	
proTGFβ1 C4S	Мышь	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNT SDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQK YSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQW LNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKR RGDLGTIHDMNRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHRR ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHE PKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIV RSCKCS	41
proTGFβ1 C4S	Яванский макак	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNT SELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWL SRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNTLQVDINGFTTGRR GDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRA LDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPG ASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVR SCKCS	42
proTGFβ1 C4S D2G	Яванский макак	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNT SELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQK	43

		YSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWL SRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNTLQVDINGFTTGRR GDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHGAL DTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPK GYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGA SAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRS CKCS	
LTBP3	Яванский макак	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKG QCRDSCQQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSGFRVVVC PLPCMNGGQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAGGAG GGTGGSGPGLSRAGALSTGALPPLAPEGDSVASKH AIYAVQVIADPPGPGEGPPAQHAAFLVPLGPGQISA EVQAPPPVVNVRVHHPPEASVQVHRIESSNAEGAA PSQHLLPHPKPSHPRPPTQKPLGRCFQDTLPKQPCGS NPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHKCPQLQYTG VQKPGPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECA MPGVCRHGDCLNNPGSYRCVCPPGHSLGPSRTQCI ADKPEEKSLCFRLVSPEHQCQHPLTTRLTRQLCCCS VGKAWGARCQRCPADGTAAFKEICPAGKGYHILTS HQTLTIQGESDFSLFLHPDGPPKPQQLPESPSQAPPP EDTEEERGVTTDSPVSEERSVQQSHPTATTSPARPY PELISRPSPPTMRWFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTETDE CRLNQNICGHGECVPGPPDYSCHCNPGYRSHPQHR YCVDVNECEAEPCGPGRGICMNTGGSYNCHCNRG YRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGFCINFPG HYKCNCYPGYRLKASRPPVCEDIDECRDPSSCPDGK CENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGACRDVNECAEGS PCSPGWCENLPGSFRCTCAQGYAPAPDGRSCVDVD ECEAGDVCDNGICTNTPGSFQCQCLSGYHLSRDRS HCEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPQGHRL VGGRKCQDIDECTQDPGLCLPHGACKNLQGSYVCV CDEGFTPTQDQHGCEEVEQPHHKKECYLNFDDTVF CDSVLATNVTQQECCCSLGAGWGDHCEIYPCPVYS SAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDECML FGAEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLLEC	44

		VDVDECLDESNCRNGVCENTRGGYRCACTPPAEYS PAQRQCLSPEEMDVDECQDPAACRPGRCVNLPGSY RCECRPPWVPGPSGRDCQLPESPAERAPERRDVCW SQRGEDGMCAGPQAGPALTFDDCCCRQGRGWGA QCRPCPPRGAGSQCPTSQSESNSFWDTSPLLLGKPR RDEDSSEEDSDECRCVSGRCVPRPGGAVCECPGGF QLDASRARCVDIDECRELNQRGLLCKSERCVNTSG SFRCVCKAGFARSRPHGACVPQRRR	
LTBP3	Мышь	GPAGERGTGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKG QCRDSCQQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSAFRVVVC PLPCMNGGQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAAGTG AGTGSSGPGLARTGAMSTGPLPPLAPEGESVASKH AIYAVQVIADPPGPGEGPPAQHAAFLVPLGPGQISA EVQAPPPVVNVRVHHPPEASVQVHRIEGPNAEGPA SSQHLLPHPKPPHPRPPTQKPLGRCFQDTLPKQPCGS NPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHKCPQLQYTG VQKPVPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECA MPGNVCHGDCLNNPGSYRCVCPPGHSLGPLAAQCI ADKPEEKSLCFRLVSTEHQCQHPLTTRLTRQLCCCS VGKAWGARCQRCPADGTAAFKEICPGKGYHILTSH QTLTIQGESDFSLFLHPDGPPKPQQLPESPSRAPPLE DTEEERGVTMDPPVSEERSVQQSHPTTTTSPPRPYP ELISRPSPPTFHRFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTETDEC RLNQNICGHGQCVPGPSDYSCHCNAGYRSHPQHRY CVDVNECEAEPCGPGKGICMNTGGSYNCHCNRGY RLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGFCINFPGH YKCNCYPGYRLKASRPPICEDIDECRDPSTCPDGKC ENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGACRDVNECSEGTP CSPGWCENLPGSYRCTCAQYEPAQDGLSCIDVDEC EAGKVCQDGICTNTPGSFQCQCLSGYHLSRDRSRCE DIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPLGHRLVGG RKCKKDIDECSQDPGLCLPHACENLQGSYVCVCDE GFTLTQDQHGCEEVEQPHHKKECYLNFDDTVFCDS VLATNVTQQECCCSLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAE FHSLVPDGKRLHSGQQHCELCIPAHRDIDECILFGAE	45

		ICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLLECVDV DECLDESNCRNGVCENTRGGYRCACTPPAEYSPAQ AQCLIPERWSTPQRDVKCAGASEERTACVWGPWA GPALTFDDCCCRQPRLGTQCRPCPPRGTGSQCPTSQ SESNSFWDTSPLLLGKSPRDEDSSEEDSDECRCVSG RCVPRPGGAVCECPGGFQLDASRARCVDIDECREL NQRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCKAGFTRSRPHGP ACLSAAADDAAIAHTSVIDHRGYFH	
LTBP1S	Яванский макак	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTLI SENGHAADTLTATNFRVVLCHLPCMNGGQCSSRD KCQCPPNFTGKLCQIPVHGASVPKLYQHSQQPGKA LGTHVIHSTHTLPLTVTSQQGVKVKFPPNIVNIHVK HPPEASVQIHQVSRIDGPTGQKTKEAQPGQSQVSYQ GLPVQKTQTIHSTYSHQQVIPHVYPVAAKTQLGRCF QETIGSQCGKALPGLSKQEDCCGTVGTSWGFNKCQ KCPKKPSYHGYNQMMECLPGYKRVNNTFCQDINE CQLQGVCPNGECLNTMGSYRCTCKIGFGPDPTFSSC VPDPPVISEEKGPCYRLVSSGRQCMHPLSVHLTKQL CCCSVGKAWGPHCEKCPLPGTAAFKEICPGGMGYT VSGVHRRRPIHHHVGKGPVFVKPKNTQPVAKSTHP PPLPAKEEPVEALTFSREHGPGVAEPEVATAPPEKEI PSLDQEKTKLEPGQPQLSPGISTIHLHPQFPVVIEKTS PPVPVEVAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDI CGAGHCINLPVRYTCICYEGYKFSEQQRKCVDIDEC TQVQHLCSQGRCENTEGSFLCICPAGFMASEEGTNC IDVDECLRPDVCGEGHCVNTVGAFRCEYCDSGYR MTQRGRCEDIDECLNPSTCPDEQCVNSPGSYQCVPC TEGFRGWNGQCLDVDECLEPNVCTNGDCSNLEGS YMCSCHKGYTRTPDHKHCKDIDECQQGNLCVNGQ CKNTEGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECQHHH LCAHGQCRNTEGSFQCVCDQGYRASGLGDHCEDIN ECLEDKSVCQRGDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDNK TCQDINECEHPGLCGPQGECLNTEGSFHCVCQQGFS ISADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCDNTAGSFRCL CYQGFQAPQDGQGCVDVNECELLSGVCGEAFCEN	46

		VEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRSRTSTDLDVEQ PKEEKKECYYNLNDASLCDNVLAPNVTKQECCCTS GAGWGDNCEIFPCPVLGTAEFTEMCPKGKGFVPAG ESSSEAGGENYKDADECLLFGQEICKNGFCLNTRPG YECYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPSSCIDGQC VNTEGSYNCFCTHPMVLDASEKRCIRPAESNEQIEE TDVYQDLCWEHLSDEYVCSRPLVGKQTTYTECCCL YGEAWGMQCALCPMKDSDDYAQLCNIPVTGRRQP YGRDALVDFSEQYAPEADPYFIQDRFLNSFEELQAE ECGILNGCENGRCVRVQEGYTCDCFDGYHLDTAK MTCVDVNECDELNNRMSLCKNAKCINTEGSYKCL CLPGYVPSDKPNYCTPLNTALNLEKDSDLE	
LTBP1S	Мышь	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGNCQNSCQKGNTTTL ISENGHAADTLTATNFRVVICHLPCMNGGQCSSRD KCQCPPNFTGKLCQIPVLGASMPKLYQHAQQQGKA LGSHVIHSTHTLPLTMTSQQGVKVKFPPNIVNIHVK HPPEASVQIHQVSRIDSPGGQKVKEAQPGQSQVSYQ GLPVQKTQTVHSTYSHQQLIPHVYPVAAKTQLGRC FQETIGSQCGKALPGLSKQEDCCGTVGTSWGFNKC QKCPKKQSYHGYTQMMECLQGYKRVNNTFCQDIN ECQLQGVCPNGECLNTMGSYRCSCKMGFGPDPTFS SCVPDPPVISEEKGPCYRLVSPGRHCMHPLSVHLTK QICCCSVGKAWGPHCEKCPLPGTAAFKEICPGGMG YTVSGVHRRRPIHQHIGKEAVYVKPKNTQPVAKST HPPPLPAKEEPVEALTSSWEHGPRGAEPEVVTAPPE KEIPSLDQEKTRLEPGQPQLSPGVSTIHLHPQFPVVV EKTSPPVPVEVAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECTV NPDICGAGHCINLPVRYTCICYEGYKFSEQLRKCVD IDECAQVRHLCSQGRCENTEGSFLCVCPAGFMASEE GTNCIDVDECLRPDMCRDGRCINTAGAFRCEYCDS GYRMSRRGYCEDIDECLKPSTCPEEQCVNTPGSYQ CVPCTEGFRGWNGQCLDVDECLQPKVCTNGSCTN LEGSYMCSCHRGYSPTPDHRHCQDIDECQQGNLCM NGQCRNTDGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECE HHHLCSHGQCRNTEGSFQCVCNQGYRASVLGDHC	47

		EDINECLEDSSVCQGGDCINTAGSYDCTCPDGFQLN DNKGCQDINECAQPGLCGSHGECLNTQGSFHCVCE QGFSISADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCDNTAGS FRCLCYQGFQAPQDGQGCVDVNECELLSGVCGEAF CENVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRSRVTEDSG VDRQPREEKKECYYNLNDASLCDNVLAPNVTKQE CCCTSGAGWGDNCEIFPCPVQGTAEFTEMCPRGKG LVPAGESSYDTGGENYKDADECLLFGEEICKNGYC LNTQPGYECYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPN SCIDGQCVNTEGSYNCFCTHPMVLDASEKRCVQPT ESNEQIEETDVYQDLCWEHLSEEYVCSRPLVGKQT TYTECCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYAQLCNI PVTGRRRPYGRDALVDFSEQYGPETDPYFIQDRFLN SFEELQAEECGILNGCENGRCVRVQEGYTCDCFDG YHLDMAKMTCVDVNECSELNNRMSLCKNAKCINT EGSYKCLCLPGYIPSDKPNYCTPLNSALNLDKESDL E	
GARP	Мышь	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQ ALYLSGNQLQSILVSPLGFYTALRHLDLSDNQISFLQ AGVFQALPYLEHLNLAHNRLATGMALNSGGLGRL PLLVSLDLSGNSLHGNLVERLLGETPRLRTLSLAEN SLTRLARHTFWGMPAVEQLDLHSNVLMDIEDGAFE ALPHLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLQVLDLSCNSIE AFQTAPEPQAQFQLAWLDLRENKLLHFPDLAVFPR LIYLNVSNNLIQLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSASPLS NPSRNASTHPLSQLLNLDLSYNEIELVPASFLEHLTS LRFLNLSRNCLRSFEARQVDSLPCLVLLDLSHNVLE ALELGTKVLGSLQTLLLQDNALQELPPYTFASLASL QRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFSGIPTLHVL NMAGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVAT GALVGLEASLEVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLKR LNLAENQLSHLPAWTRAVSLEVLDLRNNSFSLLPG NAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQ GRVDVDATQDLICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKGGL KNVNLILLLSFTLVSAIVLTTLATICFLRRQKLSQQY	48

		KA	
sGARP	Мышь	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQ ALYLSGNQLQSILVSPLGFYTALRHLDLSDNQISFLQ AGVFQALPYLEHLNLAHNRLATGMALNSGGLGRL PLLVSLDLSGNSLHGNLVERLLGETPRLRTLSLAEN SLTRLARHTFWGMPAVEQLDLHSNVLMDIEDGAFE ALPHLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLQVLDLSCNSIE AFQTAPEPQAQFQLAWLDLRENKLLHFPDLAVFPR LIYLNVSNNLIQLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSASPLS NPSRNASTHPLSQLLNLDLSYNEIELVPASFLEHLTS LRFLNLSRNCLRSFEARQVDSLPCLVLLDLSHNVLE ALELGTKVLGSLQTLLLQDNALQELPPYTFASLASL QRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFSGIPTLHVL NMAGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVAT GALVGLEASLEVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLKR LNLAENQLSHLPAWTRAVSLEVLDLRNNSFSLLPG NAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQ GRVDVDATQDLICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKGGL KNVN	49

[194] Согласно некоторым вариантам осуществления антигенные белковые комплексы могут представлять собой так называемый малый латентный комплекс (или SLC), состоящий из димерного комплекса LAP (или продомена) и домена фактора роста. Согласно другим вариантам осуществления антигенные белковые комплексы могут представлять собой так называемый большой латентный комплекс (или LLC), который дополнительно содержит презентирующую молекулу, связанную с SLC. Презентирующие молекулы включают белки LTBP (например, LTBP1, LTBP2, LTBP3 и LTBP4), белки GARP, белки LRRC33 или их фрагмент(ы). При использовании в качестве антигенных белковых комплексов LLC, как правило, минимально необходимый фрагмент, подходящий для осуществления вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, содержит по меньшей мере 50 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 100 аминокислот, белка презентирующей молекулы, содержащего по меньшей мере два остатка цистеина, способных образовывать дисульфидные связи с комплексом proTGFβ1. В частности, эти остатки Cys образуют ковалентные связи с остатками цистеина, присутствующими вблизи N-конца каждого мономера комплекса proTGFβ1.

[195] Антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, способны связываться с латентным 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 варианты альтернативного сплайсинга и/или его фрагменты. Рекомбинантные белки LTBP1 также можно модифицировать, чтобы они содержали одну или несколько детектируемых 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 (то есть лидерная последовательность была процессирована или отщеплена). Такие детектируемые метки могут включать, но без ограничения, биотиновые метки, полигистидиновые метки, метки myc, метки HA и/или флуоресцентные метки. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 представляет собой белок LTBP1 млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 представляет собой белок LTBP1 человека, обезьяны, мыши или крысы. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 46 и 47 в таблице 11. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 50 в таблице 12.

[196] Антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, способны связываться с латентным 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 в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 представляет собой рекомбинантный белок. Такой рекомбинантный белок LTBP3 может содержать LTBP3, его варианты альтернативного сплайсинга и/или его фрагменты. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 содержит лидерную последовательность (например, нативную или ненативную лидерную последовательность). Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 не содержит лидерную последовательность (то есть лидерная последовательность была процессирована или отщеплена). Рекомбинантные белки LTBP3 также можно модифицировать, чтобы они содержали одну или несколько детектируемых

меток. Такие детектируемые метки могут включать, но без ограничения, биотиновые метки, полигистидиновые метки, метки myc, метки HA и/или флуоресцентные метки. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 представляет собой белок LTBP3 млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 представляет собой белок LTBP3 человека, обезьяны, мыши или крысы. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 44 и 45 в таблице 11. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 51 в таблице 12.

[197] Антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, способны связываться с латентным 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 можно модифицировать, чтобы они стали растворимыми. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP содержит лидерную последовательность (например, нативную или ненативную лидерную последовательность). Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP не содержит лидерную последовательность (то есть лидерная последовательность была процессирована или отщеплена). Согласно другим вариантам осуществления рекомбинантные GARP модифицируют, чтобы они содержали одну или несколько детектируемых меток. Согласно другим вариантам осуществления такие детектируемые метки могут включать, но без ограничения, биотиновые метки, полигистидиновые метки, метки flag, метки myc, метки HA и/или флуоресцентные метки. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP представляет собой белок GARP млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP представляет собой белок GARP человека, обезьяны, мыши или крысы. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 48-49 в таблице 11. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 52 и 53 в таблице 13. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части,

описанные в настоящем документе, не связываются с TGFβ1 контекстно-зависимым образом, например связывание с TGFβ1 может происходить только тогда, когда молекула TGFβ1 образует комплекс с конкретной презентирующей молекулой, такой как GARP. Вместо этого антитела и их антигенсвязывающие части связываются с TGFβ1 в независящим от контекста образом. Другими словами, антитела или их антигенсвязывающие части, связываются с TGFβ1 при связывании с любой презентирующей молекулой: GARP, LTBP1, LTBP3 и/или LRCC33.

[198] Антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, способны связываться с латентным 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 рекомбинантным LRRC33. Некоторые рекомбинантные белки LRRC33 могут содержать одну или несколько модификаций, усечений и/или мутаций по сравнению с LRRC33 дикого типа. Рекомбинантные белки LRRC33 можно модифицировать, чтобы они стали растворимыми. Например, согласно некоторым вариантам осуществления эктодомен LRRC33 можно экспрессировать с С-концевой His-меткой для экспрессии растворимого белка LRRC33 (sLRRC33; смотри, 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 лидерную последовательность (то есть лидерная последовательность была процессирована или отщеплена). Согласно другим вариантам осуществления рекомбинантные белки LRRC33 модифицируют, чтобы они содержали одну или несколько детектируемых меток. Согласно другим вариантам осуществления такие детектируемые метки могут включать, но без ограничения, биотиновые метки, полигистидиновые метки, метки flag, метки myc, метки HA и/или флуоресцентные метки. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 представляет собой белок LRRC33 млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 представляет собой белок LRRC33 человека, обезьяны, мыши или крысы. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 83, 84 и 101 в таблице 13.

Таблица 17: Примеры аминокислотных последовательностей LTBP

Белок	**Последовательность**	**SEQ ID NO**
LTBP1S	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTLIS ENGHAADTLTATNFRVVICHLPCMNGGQCSSRDKCQ CPPNFTGKLCQIPVHGASVPKLYQHSQQPGKALGTHV IHSTHTLPLTVTSQQGVKVKFPPNIVNIHVKHPPEASV QIHQVSRIDGPTGQKTKEAQPGQSQVSYQGLPVQKTQ TIHSTYSHQQVIPHVYPVAAKTQLGRCFQETIGSQCGK ALPGLSKQEDCCGTVGTSWGFNKCQKCPKKPSYHGY NQMMECLPGYKRVNNTFCQDINECQLQGVCPNGECL NTMGSYRCTCKIGFGPDPTFSSCVPDPPVISEEKGPCY RLVSSGRQCMHPLSVHLTKQLCCCSVGKAWGPHCEK CPLPGTAAFKEICPGGMGYTVSGVHRRRPIHHHVGKG PVFVKPKNTQPVAKSTHPPPLPAKEEPVEALTFSREHG PGVAEPEVATAPPEKEIPSLDQEKTKLEPGQPQLSPGIS TIHLHPQFPVVIEKTSPPVPVEVAPEASTSSASQVIAPT QVTEINECTVNPDICGAGHCINLPVRYTCICYEGYRFS EQQRKCVDIDECTQVQHLCSQGRCENTEGSFLCICPA GFMASEEGTNCIDVDECLRPDVCGEGHCVNTVGAFR CEYCDSGYRMTQRGRCEDIDECLNPSTCPDEQCVNSP GSYQCVPCTEGFRGWNGQCLDVDECLEPNVCANGDC SNLEGSYMCSCHKGYTRTPDHKHCRDIDECQQGNLC VNGQCKNTEGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECQ HRHLCAHGQCRNTEGSFQCVCDQGYRASGLGDHCED INECLEDKSVCQRGDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDNK TCQDINECEHPGLCGPQGECLNTEGSFHCVCQQGFSIS ADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCDNTAGSFRCLCY QGFQAPQDGQGCVDVNECELLSGVCGEAFCENVEGS FLCVCADENQEYSPMTGQCRSRTSTDLDVDVDQPKE EKKECYYNLNDASLCDNVLAPNVTKQECCCTSGVG WGDNCEIFPCPVLGTAEFTEMCPKGKGFVPAGESSSE AGGENYKDADECLLFGQEICKNGFCLNTRPGYECYC KQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPSSCIDGQCVNTEGS	50

	QDLCWEHLSDEYVCSRPLVGKQTTYTECCCLYGEAW GMQCALCPLKDSDDYAQLCNIPVTGRRQPYGRDALV DFSEQYTPEADPYFIQDRFLNSFEELQAEECGILNGCE NGRCVRVQEGYTCDCFDGYHLDTAKMTCVDVNECD ELNNRMSLCKNAKCINTDGSYKCLCLPGYVPSDKPN YCTPLNTALNLEKDSDLE	
LTBP3	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQ CRDSCQQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSGFRVVVCPLP CMNGGQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAGGAGGGTG GSGPGLSRTGALSTGALPPLAPEGDSVASKHAIYAVQ VIADPPGPGEGPPAQHAAFLVPLGPGQISAEVQAPPPV VNVRVHHPPEASVQVHRIESSNAESAAPSQHLLPHPK PSHPRPPTQKPLGRCFQDTLPKQPCGSNPLPGLTKQED CCGSIGTAWGQSKCHKCPQLQYTGVQKPGPVRGEVG ADCPQGYKRLNSTHCQDINECAMPGVCRHGDCLNNP GSYRCVCPPGHSLGPSRTQCIADKPEEKSLCFRLVSPE HQCQHPLTTRLTRQLCCCSVGKAWGARCQRCPTDGT AAFKEICPAGKGYHILTSHQTLTIQGESDFSLFLHPDGP PKPQQLPESPSQAPPPEDTEEERGVTTDSPVSEERSVQ QSHPTATTTPARPYPELISRPSPPTMRWFLPDLPPSRSA VEIAPTQVTETDECRLNQNICGHGECVPGPPDYSCHC NPGYRSHPQHRYCVDVNECEAEPCGPGRGICMNTGG SYNCHCNRGYRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGD GGFCINFPGHYKCNCYPGYRLKASRPPVCEDIDECRD PSSCPDGKCENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGACRDVN ECAEGSPCSPGWCENLPGSFRCTCAQGYAPAPDGRSC LDVDECEAGDVCDNGICSNTPGSFQCQCLSGYHLSRD RSHCEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPQGHRL VGGRKCQDIDECSQDPSLCLPHGACKNLQGSYVCVC DEGFTPTQDQHGCEEVEQPHHKKECYLNFDDTVFCD SVLATNVTQQECCCSLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEF HSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDECMLFGSEIC KEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLLECVDVDECL DESNCRNGVCENTRGGYRCACTPPAEYSPAQRQCLSP EEMDVDECQDPAACRPGRCVNLPGSYRCECRPPWVP	51

	RGEDGMCAGPLAGPALTFDDCCCRQGRGWGAQCRP CPPRGAGSHCPTSQSESNSFWDTSPLLLGKPPRDEDSS EEDSDECRCVSGRCVPRPGGAVCECPGGFQLDASRAR CVDIDECRELNQRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCKAGF ARSRPHGACVPQRRR	

Таблица 18: Примеры аминокислотных последовательностей GARP и LRRC33

Белок	**Последовательность**	**SEQ ID NO**
GARP	AQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTETL DLSGNQLRSILASPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQ ALTHLEHLSLAHNRLAMATALSAGGLGPLPRVTSLDLS GNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRD MPALEQLDLHSNVLMDIEDGAFEGLPRLTHLNLSRNSL TCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWL DLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDS KGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSQLLNLDLSYNE IELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLM LLDLSHNALETLELGARALGSLRTLLLQGNALRDLPPY TFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPGPSGCVAFSGIT SLRSLSLVDNEIELLRAGAFLHTPLTELDLSSNPGLEVAT GALGGLEASLEVLALQGNGLMVLQVDLPCFICLKRLNL AENRLSHLPAWTQAVSLEVLDLRNNSFSLLPGSAMGGL ETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQ DLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGLKNINLIIILTFILVS AILLTTLAACCCVRRQKFNQQYKA	52
sGARP	AQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTETL DLSGNQLRSILASPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQ ALTHLEHLSLAHNRLAMATALSAGGLGPLPRVTSLDLS GNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRD MPALEQLDLHSNVLMDIEDGAFEGLPRLTHLNLSRNSL TCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWL DLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDS KGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSQLLNLDLSYNE	53

	HLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSHNAL ETLELGARALGSLRTLLLQGNALRDLPPYTFANLASLQ RLNLQGNRVSPCGGPDEPGPSGCVAFSGITSLRSLSLVD NEIELLRAGAFLHTPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEA SLEVLALQGNGLMVLQVDLPCFICLKRLNLAENRLSHL PAWTQAVSLEVLDLRNNSFSLLPGSAMGGLETSLRRLY LQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICRFSS QEEVSLSHVRPEDCEKGGLKNIN	
LRRC33 (также известен как NRROS; регистрационный номер Uniprot Q86YC3)	**MELLPLWLCLGFHFLTVG**WRNRSGTATAASQGVCK LVGGAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTL WNHSLQPYPLLESLSLHSCHLERISRGAFQEQGHLRSLV LGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRLDLSGNALTEDM AALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERLREL DLQRNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLAFNNLPCIVDFGL TRLRVLNVSYNVLEWFLATGGEAAFELETLDLSHNQLL FFPLLPQYSKLRTLLLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVA QFLLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDLADLRFLDMSQNQ FQYLPDGFLRKMPSLSHLNLHQNCLMTLHIREHEPPGA LTELDLSHNQLSELHLAPGLASCLGSLRLFNLSSNQLLG VPPGLFANARNITTLDMSHNQISLCPLPAASDRVGPPSC VDFRNMASLRSLSLEGCGLGALPDCPFQGTSLTYLDLSS NWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHSSFMAL DFSGFGNLRDLDLSGNCLTTFPRFGGSLALETLDLRRNS LTALPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQNPYDCCGVDGWGAL QHGQTVADWAMVTCNLSSKIIRVTELPGGVPRDCKWE RLDLGLLYLVLILPSCLTLLVACTVIVLTFKKPLLQVIKS RCHWSSVY * Нативный сигнал**Exposure**ьный пептид выделен жирным шрифтом.	83
Растворимый LRRC33 (sLRRC33)	**MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLG**WRNRSGTATAASQ GVCKLVGGAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANP LKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSCHLERISRGAFQEQGHL RSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRLDLSGNALT EDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERL	84

	RVLNVSYNVLEWFLATGGEAAFELETLDLSHNQLLFFP LLPQYSKLRTLLLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVAQFL LVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDLADLRFLDMSQNQFQY LPDGFLRKMPSLSHLNLHQNCLMTLHIREHEPPGALTEL DLSHNQLSELHLAPGLASCLGSLRLFNLSSNQLLGVPPG LFANARNITTLDMSHNQISLCPLPAASDRVGPPSCVDFR NMASLRSLSLEGCGLGALPDCPFQGTSLTYLDLSSNWG VLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHSSFMALDFSG FGNLRDLDLSGNCLTTFPRFGGSLALETLDLRRNSLTAL PQKAVSEQLSRGLRTIYLSQNPYDCCGVDGWGALQHG QTVADWAMVTCNLSSKIIRVTELPGGVPRDCKWERLD LGLHHHHHH * Модифицированный сигнальный пептид человеческой легкой каппа-цепи выделен жирным шрифтом. ** Гистидиновая метка подчеркнута.	
Химера человеческий LRRC33-GARP	**MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLG**WRNRSGTATAASQ GVCKLVGGAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANP LKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSCHLERISRGAFQEQGHL RSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRLDLSGNALT EDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERL RELDLQRNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLAFNNLPCIVD FGLTRLRVLNVSYNVLEWFLATGGEAAFELETLDLSHN QLLFFPLLPQYSKLRTLLLRDNNMGFYRDLYNTSSPRE MVAQFLLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDLADLRFLDMS QNQFQYLPDGFLRKMPSLSHLNLHQNCLMTLHIREHEP PGALTELDLSHNQLSELHLAPGLASCLGSLRLFNLSSNQ LLGVPPGLFANARNITTLDMSHNQISLCPLPAASDRVGP PSCVDFRNMASLRSLSLEGCGLGALPDCPFQGTSLTYL DLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHSSF MALDFSGFGNLRDLDLSGNCLTTFPRFGGSLALETLDL RRNSLTALPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQNPYDCCGVDG WGALQHGQTVADWAMVTCNLSSKIIRVTELPGGVPRD CKWERLDLGL*LIIILTFILVSAILLTTLAACC*CVRRQKFNQ QYKA	101

	легкой каппа-цепи выделен жирным шрифтом. ** Эктодомен LRRC33 подчеркнут. # Трансмембранный домен GARP выделен курсивом. ## Внутриклеточный конец GARP подчеркнут дважды.	

Вопросы безопасности/токсичности

Гистопатология, токсикология

[199] Как упомянуто выше, было подтверждено, что известные пан-ингибиторы, которые противодействуют всем изоформам TGFβ, а именно TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3, вызывают различную токсичность у многих видов млекопитающих. Наиболее известные токсические эффекты включают сердечно-сосудистую токсичность (такую как вальвулопатию) и эпителиальную гиперплазию, поражения кожи, воспаление и кровоизлияние. Более конкретно, некоторые из наблюдаемых токсических эффектов, связанных с пан-ингибиторами TGFβ (например, низкомолекулярными антагонистами TGFβR и неселективными нейтрализующими антителами), о которых сообщалось в литературе, включают нижеследующие.

[200] Сердечно-сосудистые токсические эффекты, связанные с ингибированием TGFβ, включают гиперплазию аортального клапана, правого атриовентрикулярного клапана и левого атриовентрикулярного клапана; воспаление аортального клапана, левого атриовентрикулярного клапана и восходящей аорты; кровоизлияние в восходящую аорту, аортальный клапан и левый атриовентрикулярный клапан; дегенерацию соединительной ткани в восходящей аорте (смотри, например, Strauber *et al.,* (2014) “Nonclinical safety evaluation of a Transforming Growth Factor β receptor I kinase inhibitor in Fischer 344 rats and beagle dogs” *J. Clin. Pract* 4(3): 1000196).

[201] Кроме того, нейтрализующие антитела, которые связывают все три изоформы TGFβ, связаны с определенной эпителиальной токсичностью, которая обобщена в таблице ниже.

Таблица 19: Эпителиальная и другая токсичность для разных видов для 1D11 и GC1008

	Мыши	**Яванский макак**	**Человек**
Токсичность	- Гиперплазия и воспаление языка, десен и пищевода - Результаты необратимы	- Гиперплазия десен, носового эпителия и мочевого пузыря - Анемия приводит к отмене лечения	- Кровоточивость десен - Эпистаксис - Головная боль - Слабость

	(восстановление через 12 недель)	- Изменения обратимы (кроме мочевого пузыря)	заболевания, включая кератоакантомы (KA), гиперкератоз, кожный SCC и базально-клеточную карциному
Препарат / доза / продолжительность	1D11 Дозировка: 50 мг/кг (3 раза в неделю) Продолжительность: 9-12 недель	GC1008 Дозировка: 10 и 50 мг/кг Продолжительность: 6 месяцев	GC1008 Доза: 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 15 мг/кг Продолжительность: 4 месячных дозы
Экспозиция	Конц. в сыворотке = 1-2 мг/мл (более 4-12 недель)	Не указано	Период полужизни: 21,7 дн. DN Cmax ~(350 нг/мл)мг
*Vitsky *et al., Am. J Pathology* vol. 174, 2009; и Lonning *et al., Current Pharmaceutical Biotech*, 12, 2176-2189. 2011			

[202] Заявитель настоящего изобретения ранее продемонстрировал улучшенные профили безопасности моноклональных антител, которые селективно блокируют стадию активации TGFβ1 путем нацеливания на латентный комплекс proTGFβ1 (смотри, например, WO 2017/156500 и WO 2018/129329). В токсикологических исследованиях на крысах, описанных в указанных документах, отсутствовала наблюдаемая связанная с тестируемым веществом токсичность при дозировании ингибиторов животным вплоть до 100 мг/кг в неделю в течение 4 недель.

[203] Опираясь на имеющееся понимание заявителем настоящего изобретения (смотри, например, WO 2017/156500) того, что отсутствие изоформной специфичности обычных антагонистов TGFβ может лежать в основе токсичности, связанной с ингибированием TGFβ, авторы настоящего изобретения поставили целью последующее достижение ингибирования TGFβ1 широкого спектра для лечения различных заболеваний, которые проявляются как разносторонняя дисрегуляция TGFβ1, при сохранении аспекта безопасности/переносимости изоформно-селективных ингибиторов. Таким образом, одна из целей работы, представленной в настоящем документе, заключается в поддержании по меньшей мере того же или эквивалентного уровня профилей безопасности при повышении

активности таких ингибиторов путем специального отбора среди высокоаффинных ингибиторов подмножества антител с особенно низкой скоростью диссоциации (k_{OFF}) для увеличения продолжительности действия. Действительно, представленные в настоящем документе данные показывают, что цель была достигнута.

[204] Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления новое антитело согласно настоящему изобретению характеризуется максимально допустимой дозой (MTD) >100 мг/кг при еженедельном введении в течение по меньшей мере 4 недель (например, 4, 6, 8, 10, 12 недель). Согласно некоторым вариантам осуществления новое антитело согласно настоящему изобретению характеризуется уровнем отсутствия наблюдаемых нежелательных явлений (NOAEL) вплоть до 100 мг/кг при еженедельном введении в течение по меньшей мере 4 недель у крыс. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело характеризуется NOAEL по меньшей мере 100 мг/кг в неделю при введении в течение 4 недель или 12 недель у мышей. Подходящие модели на животных для использования при проведении исследований безопасности/токсикологических исследований ингибиторов TGFβ и ингибиторов TGFβ1 включают, но без ограничения крыс, собак, яванских макаков и мышей. Согласно предпочтительным вариантам осуществления минимальное эффективное количество антитела на основании подходящего доклинического исследования эффективности ниже NOAEL. Более предпочтительно, минимальное эффективное количество антитела составляет приблизительно одну треть или менее от NOAEL. Согласно особенно предпочтительным вариантам осуществления минимальное эффективное количество антитела составляет приблизительно одну шестую или менее NOAEL. Согласно некоторым вариантам осуществления минимальное эффективное количество антитела составляет приблизительно одну десятую или менее от NOAEL.

[205] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение охватывает изоформно-селективное антитело, способное ингибировать TGFβ1-сигнализацию, которое при введении субъекту не вызывает сердечно-сосудистой или известной эпителиальной токсичности в дозе, эффективной для лечения связанного с TGFβ1 показания. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ является селективным по отношению к изоформе TGFβ1 в том смысле, что он не ингибирует TGFβ2. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ является селективным по отношению к изоформе TGFβ1 в том смысле, что он не ингибирует TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ является селективным по отношению к изоформе TGFβ1 в том смысле, что он не ингибирует TGFβ2 и TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело

характеризуется минимальным эффективным количеством приблизительно 3-10 мг/кг при введении еженедельно, раз в две недели или ежемесячно. Предпочтительно, антитело не вызывает токсичности или вызывает минимальную токсичность в дозе, которая по меньшей мере в шесть раз превышает минимальное эффективное количество (например, шестикратное терапевтическое окно). Более предпочтительно, антитело не вызывает токсичности или вызывает минимальную токсичность в дозе, которая по меньшей мере в десять раз превышает минимальное эффективное количество (например, десятикратное терапевтическое окно). Еще более предпочтительно, антитело не вызывает токсичности или вызывает минимальную токсичность в дозе, которая по меньшей мере в пятнадцать раз превышает минимальное эффективное количество (например, пятнадцатикратное терапевтическое окно).

[206] Таким образом, выбор антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для терапевтического применения может включать: выбор антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которые соответствуют критериям одного или нескольких из ингибиторов TGFβ (таких как моноклональные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, выбранные, например, из-за низкой скорости диссоциации, например k_{OFF} 10,0E-4 или менее); проведение исследования эффективности *in vivo* на подходящей доклинической модели для определения эффективного количества антитела или фрагмента; проведение исследования безопасности/токсикологического исследования *in vivo* на подходящей модели для определения количества антитела, которое является безопасным или токсичным (например, MTD, NOAEL или любых принятых в данной области техники параметров оценки безопасности/токсичности); и выбор антитела или фрагмента, которые обеспечивают по меньшей мере трехкратное терапевтическое окно (предпочтительно, 6-кратное, более предпочтительно, 10-кратное терапевтическое окно, еще более предпочтительно, 15-кратное терапевтическое окно). Выбранные антитело или фрагмент можно применять в производстве фармацевтической композиции, содержащей данные антитело или фрагмент. Такую фармацевтическую композицию можно применять в лечении связанного с TGFβ1 показания у субъекта, как описано в настоящем документе. Например, связанное с TGFβ1 показание может представлять собой фиброзное нарушение и/или пролиферативное нарушение. Предпочтительно, для выбора ингибитора TGFβ для терапевтического применения или крупномасштабного производства он не должен вызывать наблюдаемых нежелательных явлений у получивших его животных через по меньшей мере 4 недели, например 8 недель и 12 недель, непрерывного воздействия. Согласно некоторым вариантам осуществления некоторые токсические эффекты, наблюдаемые в гистопатологических анализах, не считают неблагоприятными.

Оценка иммунной безопасности

[207] Цитокины играют важную роль в нормальных иммунный ответах, но когда иммунная система становится гиперактивной, петля положительной обратной связи продукции цитокинов может приводить к «цитокиновому шторму» или гиперцитокинемии, ситуации, при которой избыточная продукция цитокинов вызывает иммунный ответ, который может повреждать органы, особенно легкие и почки, и даже приводить к смерти. Такое состояние характеризуется выраженным повышением провоспалительных цитокинов в сыворотке. В прошлом исследование фазы 1 анти-CD28 моноклонального антитела TGN1412 на здоровых добровольцах привело к опасному для жизни ответу «цитокинового шторма» в результате неожиданной системной и быстрой индукции провоспалительных цитокинов (Suntharalingam G *et al., N Engl J Med.* 2006 Sep 7;355(10):1018-28). Этот случай вызвал повышенное внимание к потенциальной опасности, связанной с фармакологической стимуляцией Т-клеток.

[208] Хотя TGFβ-направленная терапия не нацелена на специфический Т-клеточный рецептор или его лиганд, предполагается, что разумно проводить оценку иммунной безопасности, включая, например, анализы высвобождения цитокинов *in vitro*, измерения *in vivo* цитокинов в образцах плазмы отличного от человека примата, получавшего ингибитор TGFβ, и анализы тромбоцитов с использованием тромбоцитов человека.

[209] Согласно некоторым вариантам осуществления выбор ингибитора TGFβ для его терапевтического применения и/или крупномасштабного производства включает оценку способности ингибитора TGFβ вызывать высвобождение цитокинов из продуцирующих цитокины клеток. При такой оценке можно анализировать один или несколько из цитокинов (например, воспалительных цитокинов) IL-2, TNFα, IFNγ, IL-1β, CCL2 (MCP-1) и IL-6. Согласно некоторым вариантам осуществления продуцирующие цитокины клетки могут включать компоненты мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) от здоровых доноров. Цитокиновый ответ после воздействия ингибитора TGFβ (такого как раскрытое в настоящем документе антитело) можно сравнивать с высвобождением после воздействия контроля, например отрицательного контроля изотипа IgG, или любого другого подходящего контроля в зависимости от исследуемого ингибитора TGFβ. Активацию цитокинов можно оценивать в анализах в связанном с планшетом (например, иммобилизованном) и/или растворимом форматах. Уровни IFNγ, IL-2, IL-1β, TNFα, IL-6 и CCL2 (MCP-1) не должны превышать 10-кратное, например 8-, 6-, 4- или 2-кратное значение активации в отрицательном контроле. Согласно некоторым вариантам осуществления для подтверждения активации цитокинов в образце, например в PBMC, можно также использовать положительный контроль. Согласно некоторым вариантам

осуществления эти результаты высвобождения цитокинов *in vitro* могут быть дополнительно подтверждены *in vivo*, например в модели на животном, такой как токсикологическое исследование на обезьянах, например соответствующее или несоответствующее требованиям GLP 4-недельное исследование на обезьянах с повторяющимися дозами.

[210] Сообщалось, что тромбоциты человека экспрессируют GARP, который может образовывать LLC TGFβ1 (Tran *et al.*, 2009. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U S A*. 106(32): 13445–13450). Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытое в настоящем документе антитело не связывает значительно GARP, экспрессируемый на тромбоцитах. Согласно некоторым вариантам осуществления активацию тромбоцитов оценивают *in vitro*. Согласно некоторым вариантам осуществления агрегацию, связывание и активацию тромбоцитов можно оценивать в цельной крови человека или в богатой тромбоцитами плазме здоровых доноров. Агрегацию и связывание тромбоцитов после воздействия раскрытого в настоящем документе антитела можно сравнивать с воздействием отрицательного контроля, например физиологического раствора, или эталонного образца в носителе, например в буферном растворе. При выборе подходящего ингибитора TGFβ для терапевтического применения следует оценивать лекарственное средство-кандидат, чтобы убедиться, что оно не вызывает спонтанную или индуцированную агонистом активацию. Кроме того, лекарственное средство не должно мешать нормальной функции тромбоцитов (например, агрегации или свертыванию).

[211] Согласно конкретным вариантам осуществления агрегация и связывание тромбоцитов не превышают агрегацию в отрицательном контроле более чем на 10%. Согласно некоторым вариантам осуществления активацию тромбоцитов после воздействия раскрытого в настоящем документе антитела можно сравнивать с воздействием положительного контроля, например аденозиндифосфата (ADP). Статус активации тромбоцитов можно определять по поверхностной экспрессии маркеров активации, например CD62P (P-селектин) и GARP, детектируемой с помощью проточной цитометрии. Активация тромбоцитов не должна превышать активацию в отрицательном контроле более чем 10%. Согласно некоторым вариантам осуществления результаты реакции тромбоцитов *in vitro* могут быть дополнительно подтверждены *in vivo*, например в модели на животном, такой как иммунонаправленное исследование безопасности на отличных от человека приматах.

[212] Согласно некоторым вариантам осуществления выбор антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для терапевтического применения может включать: идентификацию антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которые соответствуют

одному или нескольким критериям, описанным в настоящем документе; проведение исследования эффективности *in vivo* на подходящей доклинической модели для определения эффективного количества антитела или фрагмента; проведение исследования безопасности/токсикологического исследования *in vivo* на подходящей модели для определения количества антитела, которое является безопасным или токсичным (например, MTD, NOAEL или любых принятых в данной области техники параметров оценки безопасности/токсичности); и выбор антитела или фрагмента, которые обеспечивают по меньшей мере трехкратное терапевтическое окно (предпочтительно, 6-кратное, более предпочтительно, 10-кратное терапевтическое окно, еще более предпочтительно, 15-кратное терапевтическое окно). Согласно конкретным вариантам осуществления исследование эффективности *in vivo* проводят на двух или более подходящих доклинических моделях, которые воспроизводят состояния человека. Согласно некоторым вариантам осуществления такие доклинические модели содержат TGFβ1-положительный фиброз. Согласно некоторым вариантам осуществления доклинические модели выбирают из модели фиброза печени, модели фиброза почек, модели фиброза легких, модели фиброза сердца (миокарда), модели фиброза кожи.

[213] Идентификация антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для терапевтического применения может дополнительно включать проведение анализа иммунной безопасности, который может включать, но без ограничения, измерение высвобождения цитокинов и/или определение воздействия антитела или антигенсвязывающего фрагмента на связывание, активацию и/или агрегацию тромбоцитов. Согласно конкретным вариантам осуществления высвобождение цитокинов можно измерять *in vitro* с использованием PBMC или *in vivo* с использованием доклинической модели, такой как отличные от человека приматы. Согласно конкретным вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не вызывают высвобождение IL-6, IFNγ и/или TNFα до более чем 10-кратных уровней по сравнению с уровнями в контрольном образце IgG при оценке иммунной безопасности. Согласно конкретным вариантам осуществления оценку связывания, активации и агрегации тромбоцитов можно проводить *in vitro* с использованием PBMC. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не вызывают увеличения связывания, активации и/или агрегации тромбоцитов более чем на 10% по сравнению с буфером или изотипическим контролем при оценке иммунной безопасности.

[214] Выбранные антитело или фрагмент можно применять в производстве фармацевтической композиции, содержащий данные антитело или фрагмент. Такую фармацевтическую композицию можно применять в лечении связанного с TGFβ1

показания у субъекта, как описано в настоящем документе. Например, связанное с TGFβ1 показание может представлять собой фиброзное нарушение, такое как фиброз органов, например фиброз печени. Таким образом, настоящее изобретение относится к способу производства фармацевтической композиции, содержащей ингибитор TGFβ, причем данный способ включает стадию выбора ингибитора TGFβ, который тестируют на иммунную безопасность, оцениваемую с помощью оценки иммунной безопасности, содержащей анализ высвобождения цитокинов и, необязательно, дополнительно содержащей анализ тромбоцитов. Ингибитор TGFβ, выбранный с помощью данного способа, не вызывает высвобождение цитокинов до неприемлемых уровней по сравнению с контролем (таким как контроль IgG). Аналогично, ингибитор TGFβ, выбранный с помощью данного способа, не вызывает неприемлемых уровней агрегации тромбоцитов, активации тромбоцитов и/или связывания тромбоцитов. Такой ингибитор TGFβ затем производят в больших масштабах, например 250 л или больше, например 1000 л, 2000 л, 3000 л, 4000 л или больше, для коммерческого производства фармацевтической композиции, содержащей ингибитор TGFβ.

Изоформная селективность и механизмы действия ингибиторов TGFβ

[215] Ингибиторы TGFβ, применимые для осуществления различных вариантов осуществления настоящего изобретения, нацелены на фармакологическое взаимодействие с одним или несколькими аспектами функции TGFβ1 *in vivo*. Ингибитор TGFβ может представлять собой ингибитор TGFβ1, такой как селективный по отношению к изоформе TGFβ1 ингибитор, или изоформно-неселективный ингибитор. Изоформно-неселективные ингибиторы включают без ограничения низкомолекулярные антагонисты ALK5, нейтрализующие антитела, которые связывают два или более из TGFβ1/2/3, например GC1008 и варианты, антитела, которые связывают TGFβ1/3, и ловушки лигандов, например ингибиторы TGFβ1/3.

[216] С точки зрения безопасности все большее признание получает тот факт, что широкое ингибирование различных изоформ TGFβ может быть причиной наблюдаемой токсичности, что подчеркивает тот факт, что на сегодняшний день нет успешно разработанных ингибиторов TGFβ. Чтобы обойти потенциально опасные нежелательные явления, ряд групп недавно обратились к идентификации ингибиторов, которые нацелены на *подмножество,* но не на все изоформы и все еще сохраняют эффективность. С точки зрения эффективности, однако, преобладающее мнение в этой области техники по-прежнему состоит в том, что для достижения терапевтических эффектов выгодно ингибировать несколько изоформ TGFβ, и для этого в качестве решения предлагается управление токсичностью с помощью «осторожной схемы применения» (Brennan *et al.,*

(2018) *mAbs*, 10:1, 1-17). В соответствии с этим положением ряд групп разрабатывают ингибиторы TGFβ, которые нацелены на более чем одну изоформу. Сюда относятся низкомолекулярные антагонисты рецепторов TGFβ, например антагонисты ALK5, такие как галунисертиб (моногидрат LY2157299, Eli Lilly); моноклональные антитела (такие как нейтрализующие антитела), которые ингибируют все три изоформы («пан-ингибирующие» антитела) (смотри, например, WO 2018/134681); моноклональные антитела, которые преимущественно ингибируют две из трех изоформ (например, антитела против TGFβ1/2 (например, WO 2016/161410) и TGFβ1/3 (например, WO 2006/116002 и WO 2020/051333)); ингибиторы интегрина, такие как антитела, которые связываются с интегринами $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$, $\alpha_V\beta_6$, $\alpha_V\beta_8$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ или $\alpha_8\beta_1$ и ингибируют последующую активацию TGFβ, например селективно ингибируют TGFβ1 и/или TGFβ3 (например, PLN-74809, низкомолекулярный ингибитор $\alpha_V\beta_1/\alpha_V\beta_6$ с двойной селективностью, Pliant Therapeutics, San Francisco, CA), и сконструированные молекулы (например, слитые белки), такие как ловушки лигандов (например, смотри международные публикации №№ WO 2018/029367; WO 2018/129331 и WO 2018/158727). Аналогично, ингибиторы интегринов, таких как $\alpha_V\beta_6$, также блокируют интегрин-зависимую активацию как TGFβ1, так и TGFβ3 и поэтому их можно рассматривать как изоформно-неселективные ингибиторы TGFβ-сигнализации.

[217] Ранее заявитель продемонстрировал, что ингибирования одного только TGFβ1 было достаточно для сенсибилизации иммуносупрессивных опухолей к терапии ингибитором контрольных точек даже в опухолях, в которых коэкспрессируются оба TGFβ1/3 (смотри международную публикацию № WO/2020/014460). Аналогично, показано, что TGFβ1-селективные ингибиторы смягчают фиброз в доклинических моделях, включая модель фиброза печени на мышах, в которой в фиброзной ткани коэкспрессируются обе изоформы TGFβ1/3, хотя и в различных типах клеток (в настоящем документе). Неожиданно, ингибирование TGFβ3 способствовало *профибротическим* фенотипам. При применении одного только ингибитора TGFβ3 наблюдали обострение фиброза. Кроме того, при применении в комбинации с TGFβ1-селективным ингибитором ингибитор TGFβ3 *ослаблял* антифибротический эффект TGFβ1-селективного ингибитора, о чем свидетельствует повышенное накопление коллагена в фиброзной печени. Эти результаты повышают вероятность того, что ингибирующая активность в отношении TGFβ3 может быть нежелательной особенностью ингибиторов TGFβ при применении в качестве терапевтичекого средства в ситуациях, когда фиброз представляет собой проблему.

[218] Помимо контекста фиброза, это неожиданное открытие имеет более широкое значение, поскольку профибротический фенотип (например, повышенное депонирование

коллагена в ECM) связан не только с фиброзом, но также с аспектами прогрессирования рака, такими как инвазия и метастазирование опухоли. Смотри, например, Chakravarthy *et al.,* (*Nature Communications*, (2018) 9:4692. "TGF-β-associated extracellular matrix genes link cancer-associated fibroblasts to immune evasion and immunotherapy failure"). Пораженные ткани с дисрегуляцией ECM, включая фиброзные ткани и строму различных типов опухолей, могут экспрессировать как TGFβ1, так и TGFβ3. На сегодняшний день несколько групп прилагают усилия для разработки ингибиторов TGFβ, которые нацелены на обе эти изоформы, такие как ловушки лигандов, нейтрализующие антитела и ингибиторы интегринов. Однако представленные в настоящем документе данные свидетельствуют о том, что такой подход может фактически обострять заболевание.

[219] Соответственно, настоящее изобретение содержит идею, что для лечения нарушения, связанного с дисрегуляцией ECM, такого как фиброз и рак, следует выбирать ингибитор TGFβ, который не нацелен специфически на TGFβ3. Предпочтительно, такой ингибитор является изоформно-селективным ингибитором TGFβ1. Соответствующие способы включают способ выбора ингибитора TGFβ для применения в лечении фиброзного нарушения у субъекта, причем данный способ предусматривает стадии тестирования активности одного или нескольких ингибиторов-кандидатов на способность ингибировать TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3 и выбора для терапевтического применения ингибитора, который ингибирует TGFβ1, но не ингибирует TGFβ3. Связанные способы лечения могут дополнительно предусматривать стадию введения субъекту ингибитора, который ингибирует TGFβ1, но не ингибирует TGFβ3, в количестве, достаточном для лечения фиброзного нарушения или лечения субъекта, имеющего фиброзное нарушение и/или сердечно-сосудистое заболевание или подверженного риску их развития. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекты, подверженные риску развития фиброзного нарушения, могут страдать метаболическим нарушением, таким как диабет, ожирение и NASH. Предлагаемое исключение субпопуляции пациентов направлено на снижение риска инициирования, содействия или усугубления профибротического эффекта.

[220] Согласно предпочтительным вариантам осуществления ингибитор TGFβ для применения в лечении фиброзного нарушения представляет собой изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 (такой как новые антитела с низкой k_{OFF}, раскрытые в настоящем документе), способный нацеливаться на TGFβ1-содержащие латентные комплексы *in vivo*. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор выбирают из группы, состоящей из Ab37, Ab38, Ab39, Ab40, Ab41, Ab42, Ab43, Ab44, Ab45, Ab46, Ab47, Ab48, Ab49, Ab50, Ab51 и Ab52. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab2, Ab42, Ab46,

Ab50 или их производные. Предпочтительно, изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab46 или сконструированную молекулу, содержащую его антигенсвязывающий фрагмент.

[221] Таким образом, антитело настоящего изобретения предназначено для нацеливания на следующие комплексы в очаге заболевания (например, TME или фиброзной ткани), где оно упреждающе связывает латентный комплекс, тем самым предотвращая высвобождение фактора роста: i) proTGFβ1, презентируемый GARP; ii) proTGFβ1, презентируемый LRRC33; iii) proTGFβ1, презентируемый LTBP1; и iv) proTGFβ1, презентируемый LTBP3. Как правило, вышеуказанные комплексы (i) и (ii) присутствуют на клеточной поверхности, поскольку как GARP, так и LRRC33 являются трансмембранными белками, способными презентировать или связывать латентный proTGFβ1 на внеклеточной поверхности клетки, экспрессирующей GARP или LRRC33, тогда как комплексы (iii) и (iv) являются компонентами внеклеточного матрикса. Таким образом, ингибиторы, представленные в настоящем документе, избавляются от необходимости полного связывания с эндогенными высокоаффинными рецепторами для проявления ингибирующего действия. Более того, нацеливание выше по каскаду, чем взаимодействие лиганд-рецептор может обеспечивать более продолжительные эффекты, поскольку окно доступности мишени больше и сильнее локализовано в соответствующих тканях, чем у обычных ингибиторов, которые нацелены на активные растворимые факторы роста только после их высвобождения из латентного комплекса.

[222] Ряд исследований пролил свет на механизмы активации TGFβ1. Было показано, что три интегрина, αVβ6, $\alpha_V\beta_8$ и $\alpha_V\beta_1$, являются ключевыми активаторами латентного TGFβ1 (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 αV связывают последовательность RGD, присутствующую в TGFβ1 и LAP TGFβ1, с высокой аффинностью (Dong, X., *et al.*, *Nat Struct Mol Biol*, 2014. 21(12): p. 1091-6). Трансгенные мыши с мутацией в сайте RGD TGFβ1, которая предотвращает связывание, но не секрецию интегрина, фенокопируют TGFβ1-/- мышь (Yang, Z. *et al.*, *J Cell Biol*, 2007. 176(6): p. 787-93). Мыши, у которых отсутствуют интегрины β6 и β8, повторяют все основные фенотипы мышей с нокаутом TGFβ1 и TGFβ3, включая полиорганное воспаление и расщелину неба, что подтверждает важную роль этих двух интегринов для активации TGFβ1/3 в развитии и гомеостазе (Aluwihare, P., *et al.*, *J Cell Sci*, 2009. 122(Pt 2): p. 227-32). Ключом к интегрин-зависимой активации латентного TGFβ1 является ковалентная связь с презентирующими молекулами; разрушение дисульфидных связей между GARP и LAP TGFβ1 путем мутагенеза не ухудшает образование комплекса, но

полностью устраняет активацию TGFβ1 с помощью $\alpha_V\beta_6$ (Wang, R., *et al.*, *Mol Biol Cell*, 2012. 23(6): p. 1129-39). Недавно полученная структура латентного TGFβ1 показывает, как интегрины обеспечивают высвобождение активного TGFβ1 из латентного комплекса: ковалентная связь латентного TGFβ1 с его презентирующей молекулой прикрепляет латентный TGFβ1 или к ECM с помощью LTBP, или к цитоскелету с помощью GARP или LRRC33. Связывание интегрина с последовательностью RGD приводит к зависимому от силы изменению в структуре LAP, что обеспечивает высвобождение активного TGFβ1 и его связывание с близлежащими рецепторами (Shi, M., *et al.*, *Nature*, 2011. 474(7351): p. 343-9). Также хорошо подтверждена важность интегрин-зависимой активации TGFβ1 при заболевании. Низкомолекулярный ингибитор αVβ1 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), а блокада $\alpha_V\beta_6$ антителом или потеря экспрессии интегрина β6 подавляют индуцированный блеомицином фиброз легких и индуцированный облучением фиброз (Munger, J.S., *et al.*, *Cell*, 1999. 96(3): p. 319-28); Horan, G.S., *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med*, 2008. 177(1): p. 56-65). В дополнение к интегринам обнаружены другие механизмы активации TGFβ1, включая тромбоспондин-1 и активацию протеазами, такими как тромбин, плазмин, матриксные металлопротеиназы (MMP, например MMP2, MMP9 и MMP12), катепсин D и калликреин. Нокаут тромбоспондина-1 повторяет некоторые аспекты фенотипа TGFβ1-/- в некоторых тканях, но не защищает от индуцированного блеомицином фиброза легких, о котором известно, что он является TGFβ-зависимым (Ezzie, M.E., *et al.*, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. 44(4): p. 556-61). Кроме того, нокаут протеаз-кандидатов не приводил к фенотипу TGFβ1 (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 тем, что эти механизмы имеют решающее значение при определенных заболеваниях, а не в развитии и гомеостазе.

[223] Антитела согласно настоящему изобретению работают, предотвращая стадию активации TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы могут ингибировать интегрин-зависимую (например, механическую или силовую) активацию TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы могут ингибировать протеаза-зависимую или протеаза-индуцированную активацию TGFβ1. Последнее включает ингибиторы, которые ингибируют стадию активации TGFβ1 интегрин-независимым образом. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы могут ингибировать активацию TGFβ1 независимо от способа активации, например ингибировать как интегрин-зависимую активацию, так и протеаза-зависимую активацию TGFβ1. Неограничивающие примеры протеаз, которые могут активировать TGFβ1,

включают сериновые протеазы, такие как калликреины, хемотрипсин, трипсин, эластазы, плазмин, тромбин, а также цинковые металлопротеазы (семейство MMP), такие как MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13 и протеазы ADAM (например, ADAM10 и ADAM17). Калликреины включают плазменные калликреины и тканевые калликреины, такие как KLK1, KLK2, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK9, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13, KLK14 и KLK15. Представле214нные в настоящем документе данные демонстрируют примеры изоформно-специфичных ингибиторов TGFβ1, способных ингибировать калликреин-зависимую активацию TGFβ1 *in vitro*. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы настоящего изобретения предотвращают высвобождение или диссоциацию активного (зрелого) фактора роста TGFβ1 из латентного комплекса.

[224] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению могут индуцировать интернализацию комплекса, содержащего proTGFβ1, связанный с LRRC33 или GARP, на клеточной поверхности. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела являются ингибиторами клеточно-ассоциированного TGFβ1 (например, презентируемого GARP proTGFβ1 и презентируемого LRRC33 proTGFβ1). Настоящее изобретение относится к антителам или их фрагментам, которые специфически связывают такой комплекс (например, GARP-proTGFβ1/латентный TGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1/латентный TGFβ1), тем самым запуская интернализацию комплекса (например, эндоцитоз). Этот способ действия вызывает удаление или истощение неактивных комплексов TGFβ1 с клеточной поверхности (например, Treg, макрофагов, MDSC и так далее), тем самым уменьшая количество доступного для активации латентного TGFβ1.

Ингибиторы TGFβ, подходящие для терапевтического применения

[225] Совокупность данных подтверждает мнение о том, что многие заболевания проявляются сложными нарушениями TGFβ-сигнализации, которые, вероятно, включают участие гетерогенных типов клеток, которые обеспечивают различные эффекты функции TGFβ, которые опосредованы его взаимодействиями с так называемыми презентирующими молекулами. Было идентифицировано по меньшей мере четыре такие презентирующие молекулы, которые могут «презентировать» TGFβ в различных внеклеточных нишах, обеспечивая его активацию в ответ на локальные стимулы. В одной категории TGFβ депонируется в ECM в ассоциации с ECM-ассоциированными презентирующими молекулами, такими как LTBP1 и LTBP3, которые опосредуют ECM-ассоциированную активность TGFβ. В другой категории TGFβ связан на поверхности клеток (например, иммунных клеток) посредством презентирующих молекул, таких как GARP и LRRC33,

которые опосредуют определенную иммунную функцию. Эти презентирующие молекулы демонстрируют неодинаковую экспрессию, локализацию и/или функцию в различных типах тканей и клеток, что указывает на то, что инициирующие события и результат активации TGFβ будут различаться в зависимости от биологического или патологического микроокружения. Исходя из представления о том, что многие эффекты TGFβ могут взаимодействовать и способствовать прогрессированию заболевания, терапевтические средства, которые могут противодействовать ряду аспектов функции TGFβ, могут обеспечивать более высокую эффективность.

[226] Согласно предпочтительным вариантам осуществления ингибитор TGFβ для применения в лечении фиброзного нарушения представляет собой изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 (такой как новые антитела с низкой k_{OFF}, раскрытые в настоящем документе), способный нацеливаться на TGFβ1-содержащие латентные комплексы *in vivo*. Согласно наиболее предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные. Предпочтительно, изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab46 или сконструированную молекулу, содержащую его антигенсвязывающий фрагмент.

[227] Было установлено, что при различных заболеваниях гетерогенные популяции клеток представляют собой ряд источников TGFβ1, которые вместе способствуют патогенезу и/или прогрессированию заболевания. Более одного типа TGFβ1-содержащих комплексов («контекстов»), вероятно, сосуществуют в одном и том же микроокружении заболевания. Поэтому способность ингибировать TGFβ1 в различных биологических контекстах может иметь важное значение.

[228] Однако в определенных ситуациях так называемые антитела с предпочтением контекста, которые все еще специфически связываются со всеми четырьмя антигенными комплексами, но с более сильной аффинностью к матрикс-ассоциированным комплексам по сравнению с клеточно-ассоциированными комплексами, могут иметь преимущество. Эта особенность, то есть неодинаковая аффинность связывания этих антител с комплексами ECM по сравнению с комплексами иммунных клеток, может повышать вероятность того, что такие ингибиторы могут оказаться особенно подходящими в качестве терапевтических средств для лечения фиброзных состояний, таких как фиброз органов, при которых заболевшие пациенты получают продолжительную терапевтическую схему для лечения хронических состояний. В этих обстоятельствах желательно сводить к минимуму нежелательное воспаление, вызываемое иммунной стимуляцией.

[229] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению характеризуются более высокой аффинностью в отношении EMC-комплексов, например hLTBP1-proTGFβ1 и hLTBP3-proTGFβ1 (KD<1 нМ) по сравнению с клеточно-ассоциированными комплексами, определенной, например, с помощью титрования при равновесии в растворе. Предполагается, что антитела с предпочтением EMC способны преимущественно нацеливаться на EMC-ассоциированный TGFβ1 и ингибировать его *in vivo*. Такие антитела могут быть полезны для применения в лечении состояний с дисрегуляцией ECM, таких как аномальное ремоделирование и/или жесткость ECM. Обычно дисрегуляция ECM может сопровождаться увеличением количества миофибробластов или миофибробласт-подобных клеток в окружении заболевания, таком как опухолевое микроокружение и фиброзное микроокружение. Многие аномальные особенности ECM часто проявляются в широком диапазоне патологических состояний, включая фиброз и пролиферативные нарушения, по меньшей мере частично обусловленные путем TGFβ1.

[230] Антитела с предпочтением контекста с более слабым связыванием с GARP-ассоциированным комплексом TGFβ (например, человеческий GARP-proTGFβ1) можно применять в лечении состояния, при котором нежелательно стимулировать иммунный ответ субъекта, и/или в ситуациях где ожидается, что субъект получит пользу от длительной терапии ингибированием TGFβ для сдерживания хронического состояния, такого как многие типы фиброза. Есть по меньшей мере три причины терапевтического применения ингибитора TGFβ1 с более слабой аффинностью связывания с GARP-proTGFβ1:

[231] Во-первых, GARP преимущественно экспрессируется на регуляторных Т-клетках, которые играют решающую роль в поддержании иммунной толерантности к собственным антигенам и в предотвращении аутоиммунных заболеваний. Поскольку Treg обычно подавляют, ослабляют или понижающе регулируют индукцию и пролиферацию эффекторных Т-клеток, системное ингибирование этой функции может приводить к сверхактивному или завышенному иммунному ответу у хозяина за счет отключения «остановки», которую обычно обеспечивают Treg-клетки. Таким образом, принятый в настоящем документе подход (например, ингибирование TGFβ1 без полного отключения функции Treg) направлен на то, чтобы избежать риска возникновения аутоиммунитета. Кроме того, пациенты, у которых уже есть склонность к развитию сверхчувствительных иммунных реакций или аутоиммунитета, могут подвергаться особому риску инициации или обострения таких состояний при недоступности функциональных Treg; и, следовательно, ингибиторы, которые по меньшей мере частично сохраняют функцию GARP-опосредованного TGFβ1, могут эффективно минимизировать такой риск.

[232] Во-вторых, данные свидетельствуют о том, что изменение соотношения Th17/Treg приводит к дисбалансу профибротических цитокинов Th17, что коррелирует с тяжестью фиброза, такого как фиброз печени (смотри, например, Shoukry *et al.,* (2017) *J Immunol* 198 (1 Supplement): 197,12). Авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что отключение нарушения связанной с GARP части функции TGFβ1 может прямо или косвенно усугублять фиброзные состояния.

[233] В-третьих, регуляторные Т-клетки необходимы для иммунного гомеостаза и предотвращения аутоиммунитета. Было высказано предположение, что особенно для терапии ингибированием TGFβ1, предназначенной для длительного или хронического введения, было бы желательно сохранять по меньшей мере часть GARP-опосредованного TGFβ1 и избегать потенциальных побочных эффектов, вызываемых полным нарушением нормальной функции Treg при поддержании иммунного гомеостаза (рассмотрено, например, в документе Richert-Spuhler and Lund (2015) *Prog Mol Biol Transl Sci.* 136: 217–243). Эта стратегия по меньшей мере частично направлена на сохранение нормальной иммунной функции, которая необходима в том числе для борьбы с инфекциями.

Связанные с TGFβ1 показания

[234] Описанные в настоящем документе изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1 можно применять для лечения связанного с TGFβ1 показания у субъектов. Было высказано предположение, что различные болезненные состояния связаны с дисрегуляцией TGFβ-сигнализации как со способствующим фактором. Действительно, патогенез и/или прогрессирование определенных состояний человека, по-видимому, в основном управляются активностью TGFβ1 или зависят от нее. Более того, предполагается, что существует перекрестное взаимодействие между TGFβ1-восприимчивыми клетками. В некоторых случаях взаимодействие между разносторонними активностями оси TGFβ1 могут запускать каскад событий, которые приводят к прогрессированию заболевания, обострению и/или подавлению способности хозяина бороться с заболеванием. Например, определенные микроокружения заболевания, такие как опухолевое микроокружение (TME), могут быть связаны с TGFβ1, презентируемым рядом различных презентирующих молекул, например с LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1, LRRC33-proTGFβ1 и любыми их комбинациями. Активность TGFβ1 в одном контексте может, в свою очередь, регулировать или влиять на активность TGFβ1 в другом контексте, повышая вероятность того, что при дисрегуляции это может приводить к обострению болезненных состояний. Поэтому желательно широко ингибировать различные варианты функции TGFβ1 (то есть, различные контексты), при этом селективно ограничивая такое ингибирующее действие изоформой TGFβ1. Цель состоит в том, чтобы не нарушать

гомеостатическую TGFβ-сигнализацию, опосредуемую другими изоформами, включая TGFβ3, который играет важную роль в заживлении ран.

[235] Более того, недавние наблюдения на моделях фиброза у мышей предполагают вредное воздействие ингибирования TGFβ3 (смотри пример 17) в тканях с дисрегуляцией ECM, что повышает вероятность того, что роль TGFβ3 выходит за рамки гомеостаза. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что дисрегуляция ECM обнаруживается при ряде болезненных состояний, включая фиброз и рак. Действительно, многие ключевые профибротические гены также оказались среди маркеров различных видов рака. Эти маркеры включают, например, col1A1, col3A1, PAI-1, CCL2, ACTA2, FN-1, CTGF и TGFB1. Поэтому вывод о том, что одновременная блокада TGFβ3 оказывается вредной при фиброзе, может быть применим к более широкому кругу состояний, связанных с дисрегуляцией ECM.

[236] В дополнение к возможным проблемам ингибирования TGFβ3, рассмотренным выше, Takahashi *et al.,* (Nat Metab. 2019, 1(2): 291-303) недавно сообщили о полезной роли TGFβ2 в регуляции метаболизма. Авторы идентифицировали TGFβ2 как индуцируемый физической нагрузкой адипокин, который стимулирует поглощение глюкозы и жирных кислот *in vitro*, а также поглощение глюкозы тканями *in vivo*; который улучшает метаболизм у мышей с ожирением; и который уменьшает воспаление, вызванное диетой с высоким содержанием жиров. Кроме того, авторы наблюдали, что лактат, метаболит, высвобождаемый из мышц во время упражнений, стимулировал экспрессию TGFβ2 в человеческих адипоцитах и что снижающее уровень лактата средство снижало уровни циркулирующего TGFβ2 и уменьшало вызванное физическими упражнениями улучшение толерантности к глюкозе. Эти наблюдения заставляют предполагать, что терапевтическое применение ингибитора TGFβ с ингибирующим действие в отношении изоформы TGFβ2 может быть вредным по меньшей мере в метаболическом аспекте.

[237] Соответственно, настоящее раскрытие относится к ингибитору TGFβ для применения в лечении связанного с TGFβ1 показания (например, фиброза) у субъекта, причем данный ингибитор TGFβ ингибирует TGFβ1, но не ингибирует TGFβ2. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект получает пользу от улучшения метаболизма, причем, необязательно, у субъекта есть метаболическое заболевание, такое как ожирение, вызванное диетой с высоким содержанием жиров воспаление, нарушение регуляции глюкозы (например, диабет), или он подвержен риску развития такого заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с TGFβ1 показание представляет собой рак, причем, необязательно, рак включает солидную опухоль, например местнораспространенный рак и метастатический рак. Согласно некоторым вариантам

осуществления связанное с TGFβ1 показание представляет собой миелофиброз. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с TGFβ1 показание представляет собой иммунное нарушение. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с TGFβ1 показание представляет собой фиброз.

[238] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ является TGFβ1-селективным в том смысле, что он не ингибирует TGFβ2. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ является TGFβ1-селективным в том смысле, что он не ингибирует TGFβ3. Согласно предпочтительным вариантам осуществления ингибитор TGFβ является TGFβ1-селективным в том смысле, что он не ингибирует TGFβ2 и TGFβ3.

[239] Соответствующие способы выбора ингибитора TGFβ для терапевтического применения также включены в настоящий документ. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ является TGFβ1-селективным.

[240] Согласно предпочтительным вариантам осуществления TGFβ1-селективные ингибиторы подбирают для применения в лечении пациентов с ожирением печени (например, неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD)) или фиброзом, связанным с неалкогольным стеатогепатитом (NASH). Это основано по меньшей мере на том соображении, что i) отказ от ингибирования TGFβ3 может снижать риск усугубления дисрегуляции ECM (которая может увеличивать фиброз) и ii) отказ от ингибирования TGFβ2 может снижать риск увеличения метаболической нагрузки у пациентов. Настоящее изобретение расширяет понятие выбора «правильного ингибитора TGFβ1» для «правильной популяции пациентов» для лечения болезненного состояния с определенными критериями и/или клиническими признаками. Можно сделать по меньшей мере две проверки в отношении идентификации/отбора подходящих признаков и/или популяций пациентов, для которых ингибиторы TGFβ1, описанные в настоящем документе, вероятно, будут оказывать благоприятное действие (например, клиническую пользу): i) вызвано ли заболевание изоформой TGFβ1 или преимущественно зависит от нее по сравнению с другими изоформами у человека (или они по меньшей мере кодоминируют); и ii) связано ли заболевание с матрикс-ассоциированной и/или с ассоциированной с иммунными клетками функцией TGFβ1.

[241] Дифференциальная экспрессия трех известных изоформ TGFβ, а именно TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3, наблюдается при нормальных (здоровых; гомеостатических), а также болезненных состояниях в различных тканях (следует отметить, что для обозначения гена в отличие от белка иногда используется «TGFB»). Тем не менее, концепция изоформной селективности не была ни полностью разработана, ни достигнута с помощью

традиционных подходов, которые благоприятствуют пан-ингибированию нескольких изоформ TGFβ. Более того, профили экспрессии изоформ могут неодинаково регулироваться не только в нормальных (гомеостатических) и в аномальных (патологических) состояниях, но также в различных субпопуляциях пациентов. Поскольку большинство доклинических исследований проводится на ограниченном числе моделей на животных, данные, полученные с использованием таких моделей, могут быть необъективными, что приводит к неправильной интерпретации данных или вводящим в заблуждение выводам в отношении применимости к состояниям человека (то есть переносимости).

[242] Соответственно, настоящее изобретение включает признание того, что дифференциальную экспрессию изоформ TGFβ в доклинических моделях на животных следует принимать во внимание при прогнозировании эффективности конкретных ингибиторов, а также при осмысленной интерпретации доклинических данных в отношении переносимости в клинические состояния человека. Как показано в настоящем документе, TGFβ1 и TGFβ3 являются кодоминирующими в некоторых моделях сингенного рака у мышей (например, EMT-6 и 4T1), которые широко используются в доклинических исследованиях (смотри **фиг. 13D**). Напротив, многие другие модели рака (например, S91, B16 и MBT-2) экспрессируют почти исключительно TGFβ1, аналогично тому, что наблюдается во многих опухолях человека, в которых TGFβ1 чаще оказывается доминирующей над TGFβ2/3 изоформой (смотри **фиг. 13B** и **13C**). Кроме того, изоформа(ы) TGFβ, экспрессируемая преимущественно в гомеостатических состояниях, может не быть изоформой(ами), ассоциированной с заболеванием. Например, в нормальной ткани легких у здоровых крыс тоническая TGFβ-сигнализация оказалась опосредована главным образом TGFβ3. Однако оказалось, что в болезненных состояниях, таких как фиброз легких, происходит заметная повышающая регуляция TGFβ1. В целом, полезно тестировать или подтверждать относительную экспрессию изоформ TGFβ в клинических образцах, чтобы подбирать подходящие терапевтические средства, на которые пациент, вероятно, ответит.

[243] Как описано в настоящем документе, изоформно-селективные ингибиторы TGFβ1 особенно полезны для лечения заболеваний, при которых по сравнению с другими изоформами преимущественно экспрессируется изоформа TGFβ1 (например, называемых TGFβ1-доминантными). В качестве примера, неограничивающий перечень клинических образцов рака человека с относительными уровнями экспрессии TGFB1 (*слева*), TGFB2 (*в середине*) и TGFB3 (*справа*) представлен на **фиг. 13C**. Каждая горизонтальная линия по трем изоформам соответствует одному пациенту. Как можно видеть, общая экспрессия TGFβ1 (TGFB1) в большинстве этих человеческих опухолей/раков значительно выше, чем

других двух изоформ во многих типах опухолей/раков, что позволяет предположить, что TGFβ1-селективное ингибирование может быть полезным при этих типах заболеваний. Более поздние биоинформационные анализы также подтверждают представление о том, что TGFβ1 является основной движущей силой ряда болезненных состояний.

[244] Согласно некоторым вариантам осуществления TGFβ1-селективных ингибиторов, раскрытых в настоящем документе, достаточно для лечения заболевания (например, фиброза, солидных опухолей и так далее) несмотря на коэкспрессию TGFβ1 и TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело выбирают из группы: Ab37, Ab38, Ab39, Ab40, Ab41, Ab42, Ab43, Ab44, Ab45, Ab46, Ab47, Ab48, Ab49, Ab50, Ab51 и Ab52. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор TGFβ1 представляет собой Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные. Предпочтительно, изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab46 или сконструированную молекулу, содержащую его антигенсвязывающий фрагмент.

[245] В некоторых случаях полезно тестировать или подтверждать относительные уровни экспрессии трех изоформ TGFβ (то есть TGFβ1/TGFB1, TGFβ2/TGFB2 и TGFβ3/TGFB3) в клинических образцах, взятых у отдельных пациентов. Такая информация может обеспечивать более точное прогнозирование эффективности конкретной терапии у отдельных пациентов или популяций пациентов, что может помогать делать уверенный выбор соответствующей схемы лечения (например, индивидуализированное/персонализированное лечение) для повышения вероятности клинического ответа.

[246] Соответственно, настоящее изобретение относится к способу отбора популяции пациентов или субъекта, которые, вероятно, ответят на терапию, включающую изоформно-специфичный ингибитор TGFβ1 согласно настоящему изобретению. Такой способ предусматривает стадии: предоставления биологического образца (например, клинического образца), взятого у субъекта, определения (например, измерения или анализа) относительных уровней TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3 в образце и введения субъекту композиции, содержащей ингибитор TGFβ1, если TGFβ1 является доминирующей над TGFβ2 и TGFβ3 изоформой; и/или если TGFβ1 значительно сверхэкспрессирован или повышающе отрегулирован по сравнению с контролем. Согласно некоторым вариантам осуществления такой способ предусматривает стадии: получения информации об относительных уровнях экспрессии TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3, которые были определены ранее; идентификации у субъекта TGFβ1-положительного, предпочтительно TGFβ1-доминантного, заболевания; и введения субъекту ингибитора TGFβ1. Согласно некоторым

вариантам осуществления у такого субъекта есть заболевание (такое как рак), которое резистентно к терапии (такой как терапия рака). Согласно некоторым вариантам осуществления такой субъект демонстрирует непереносимость терапии и поэтому прекратил или, вероятно, прекратит терапию. Добавление ингибитора TGFβ1 в терапевтическую схему может позволять снижать дозировку первой терапии и по-прежнему получать клиническую пользу в комбинации. Предпочтительно, изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab46 или сконструированную молекулу, содержащую его антигенсвязывающий фрагмент.

[247] Относительные уровни изоформ могут быть определены с помощью анализов на основе РНК и/или анализов на основе белка, которые хорошо известны в данной области техники. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия введения может также включать другую терапию, такую как ингибиторы иммунных контрольных точек или другие средства, представленные в другом месте настоящего документа. Такие способы могут необязательно включать стадию оценки терапевтического ответа путем мониторинга изменений относительных уровней TGFβ1/TGFB1, TGFβ2/TGFB2 и TGFβ3/TGFB3 в двух или нескольких временных точках. Согласно некоторым вариантам осуществления клинические образцы (такие как биопсии) отбирают как до, так и после введения. Согласно некоторым вариантам осуществления клинические образцы (такие как биопсии) отбирают несколько раз после лечения для оценки эффектов *in vivo* с течением времени.

[248] В дополнение к первой проверке, направленной на аспект изоформной специфичности, вторая проверка исследует широту функции TGFβ1, связанную с конкретным заболеванием. Ее можно представить количеством *контекстов* TGFβ1, а именно тем, какая презентирующая молекула(ы) опосредует ассоциированную с заболеванием функцию TGFβ1. TGFβ1-специфичные ингибиторы широкого контекста, такие как не зависящие от контекста ингибиторы, полезны для лечения заболеваний, которые связаны как с ECM-компонентом, так и с иммунным компонентом функции TGFβ1. Такое заболевание может быть связано с дисрегуляцией ECM, а также с нарушением функции иммунных клеток или иммунного ответа.

[249] Связано ли конкретное состояние пациента с несколькими аспектами функции TGFβ1 или вызвано ими или же нет, можно оценить путем определения профилей экспрессии презентирующих молекул в клиническом образце, взятом у пациента. В данной области техники известны различные анализы, которые можно проводить для получения профилей экспрессии, включая анализы на основе РНК и анализы на основе белка. Относительные уровни экспрессии LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33 в образце(ах) (и/или их изменения/поправки) могут указывать на источник и/или контекст активности TGFβ1,

связанной с состоянием. Например, образец биопсии, взятый из солидной опухоли, может демонстрировать высокую экспрессию всех четырех презентирующих молекул. Например, LTBP1 и LTBP3 могут быть высоко экспрессированы в CAF в строме опухоли, в то время как GARP и LRRC33 могут быть высоко экспрессированы ассоциированными с заболеванием иммунными клетками, такими как Treg, MDSC и лейкоцитарный инфильтрат, соответственно. Аналогично, LTBP1 и LTBP3 могут быть высоко экспрессированы в FAF (например, в миофибробластах) в фиброзном микроокружении, тогда как LRRC33 может быть высоко экспрессирован ассоциированными с фиброзом иммунными клетками, такими как M2-макрофаги и MDSC.

[250] Соответственно, настоящее изобретение относится к способу определения (например, тестирования или подтверждения) участия TGFβ1 в заболевании по сравнению с TGFβ2 и TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно содержит стадию идентификации источника (или контекста) ассоциированного с заболеванием TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления источник/контекст оценивают путем определения экспрессии презентирующих TGFβ молекул, например LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33, в клиническом образце, взятом у пациентов. Согласно некоторым вариантам осуществления используют биопсии тканей. Согласно некоторым вариантам осуществления гистопатологические анализы могут включать цифровую патологию.

[251] Изоформно-селективные ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, можно применять для лечения широкого спектра заболеваний, нарушений и/или состояний, связанных с дисрегуляцией TGFβ1 (то есть, связанных с TGFβ1 показаний) у субъектов-людей. При использовании в настоящем документе «заболевание (нарушение или состояние), связанное с дисрегуляцией TGFβ1» или «связанное с TGFβ1 показание» означают любое заболевание, нарушение и/или состояние, связанное с экспрессией, активностью и/или метаболизмом TGFβ1, или любое заболевание, нарушение и/или состояние, при котором может принести пользу ингибирование активности и/или уровней TGFβ1. Предпочтительно, изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab46 или сконструированную молекулу, содержащую его антигенсвязывающий фрагмент.

[252] Настоящее изобретение относится к применению такого изоформно-специфичного ингибитора TGFβ1 в способе лечения заболевания, связанного с дисрегуляцией TGFβ1 у субъекта-человека. Такой ингибитор обычно включают в состав фармацевтической композиции, которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное средство. TGFβ является ключевым регулятором

компонентов, структуры и функции ECM. Преимущественно, ингибитор нацелен как на ECM-ассоциированную TGFβ1-сигнализацию, так и на ассоциированную с иммунными клетками TGFβ1-сигнализацию, но не нацелен на сигнализацию TGFβ2 и/или TGFβ3 *in vivo*. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор предпочтительно связывает ECM-ассоциированные комплексы proTGFβ1, тем самым блокируя TGFβ1-сигнализацию в нише матрикса. Заболевание может быть связано с дисрегуляцией или нарушением в компонентах или функции ECM и вызывать увеличение депонирования коллагена. Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение в компонентах или функции ECM может дополнительно содержать повышение жесткости и/или реорганизацию ECM. Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение в компонентах или функции ECM включает увеличение количества клеток миофибробластов в очаге заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция ECM включает повышение жесткости матрикса. Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция ECM связана с фибронектином и/или фибриллином. Предпочтительно, изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab46 или сконструированную молекулу, содержащую его антигенсвязывающий фрагмент.

[253] Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание характеризуется дисрегуляцией или нарушением пролиферации или дифференцировки миелоидных клеток; причем, необязательно, дисрегуляция или нарушение в миелоидных клетках содержит рекрутирование моноцитов в очаг заболевания или дифференцировку в поляризованные M2-клетки и/или аномальную функцию макрофагов. Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция миелоидных клеток содержит повышение уровней MDSC. Повышение уровня MDSC может включать повышенное количество/плотность циркулирующих MDSC, например в периферической крови. Повышение уровня MDSC можно наблюдать в очаге заболевания, таком как фиброзные ткани и солидные опухоли. Термины циркулирующий и циркуляторный (например, «циркулирующие MDSC» и «циркуляторные MDSC») можно применять взаимозаменяемо.

[254] Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание представляет собой фиброзное нарушение или заболевание (такое как фиброз органов). Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способам применения измерений циркулирующих MDSC в лечении фиброза у субъектов, которым вводят ингибитор TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ является селективным по отношению к изоформе TGFβ1 в том смысле, что он не ингибирует TGFβ2. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ

является селективным по отношению к изоформе TGFβ1 в том смысле, что он не ингибирует TGFβ3. Предпочтительно, ингибитор TGFβ является селективным по отношению к изоформе TGFβ1 в том смысле, что он не ингибирует TGFβ2 и TGFβ3. Кроме того, согласно некоторым вариантам осуществления популяцию циркулирующих MDSC можно применять в качестве раннего прогностического биомаркера эффективности лечения фиброзного нарушения, например в тот момент времени, когда другие маркеры эффективности лечения еще не могут быть обнаружены.

[255] Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание характеризуется аномальной дифференцировкой клеток, включая эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) и/или эндотелиально-мезенхимальный переход (EndMT). Согласно некоторым вариантам осуществления эти процессы, происходящие в очагах заболевания (таких как TME и фиброзное микроокружение), приводят к увеличению количества миофибробластов или миофибробласт-подобных клеток в очаге. К ним относятся, например, CAF и FAF.

[256] Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание характеризуется аномальной экспрессией генов одного или нескольких из маркерных генов, выбранных из группы, состоящей из PAI-1, ACTA2, CCL2, Col1a1, Col3a1, FN-1, CTGF и TGFB1.

[257] Терапевтически эффективное количество такого ингибитора вводят субъекту, который страдает от заболевания или у которого оно диагностировано.

[258] Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение дифференцировки фибробластов включает повышение уровня миофибробластов или миофибробласт-подобных клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления миофибробласты или миофибробласт-подобные клетки представляют собой рак-ассоциированные фибробласты (CAF). Согласно некоторым вариантам осуществления CAF ассоциированы со стромой опухоли и могут продуцировать CCL2/MCP-1 и/или CXCL12/SDF-1. Согласно некоторым вариантам осуществления миофибробласты или миофибробласт-подобные клетки локализованы в фиброзной ткани.

[259] Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение в регуляторных Т-клетках включает повышение активности Treg.

[260] Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение пролиферации или функции эффекторных Т-клеток (Teff) включает подавление пролиферации CD4+/CD8+ клеток.

[261] Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение пролиферации или дифференцировки миелоидных клеток включает усиление пролиферации миелоидных клеток-предшественником. Усиленная пролиферация миелоидных клеток может происходить в костном мозге.

[262] Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение дифференцировки моноцитов включает усиление дифференцировки происходящих из костного мозга и/или тканевых резидентных моноцитов в макрофаги в очаге заболевания, таком как фиброзная ткань и/или солидная опухоль.

[263] Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение рекрутирования моноцитов включает усиление рекрутирования происходящих из костного мозга моноцитов в очаг заболевания, такой как TME, что приводит к усилению дифференцировки и M2-поляризация макрофагов с последующим увеличением количества TAM.

[264] Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение функции макрофагов включает усиление поляризации макрофагов в M2-фенотипы.

[265] Согласно некоторым вариантам осуществления дисрегуляция или нарушение пролиферации или дифференцировки миелоидных клеток включает повышение количества Treg, MDSC и/или TAN.

[266] Связанные с TGFβ показания могут включать состояния, включающие исключающее иммунный ответ микроокружение заболевания, такой как опухоль или раковая ткань, которые частично подавляют нормальный защитный механизм/иммунитет организма за счет исключения эффекторных иммунных клеток (например, CD4+ и/или CD8+ Т-клеток). Согласно некоторым вариантам осуществления такие исключающие иммунный ответ состояния связаны с плохим реагированием на лечение (например, на терапию рака). Неограничивающие примеры терапий рака, к которым пациенты плохо восприимчивы, включают, но без ограничения: терапию ингибиторами контрольных точек, вакцины от рака, химиотерапию и лучевую терапию. Без ограничения конкретной теорией предполагается, что ингибиторы TGFβ, такие как описанные в настоящем документе, могут помогать противодействовать способности опухоли обходить или исключать противораковый иммунитет путем восстановления доступа Т-клеток (например, CD8+ клеток) путем стимуляции размножения Т-клеток и/или их инфильтрации в опухоль.

[267] Таким образом, ингибирование TGFβ может преодолевать резистентность к лечению (например, резистентность к иммунным контрольным точкам, резистентность к вакцине от рака, резистентность к CAR-T, резистентность к химиотерапии, резистентность к лучевой терапии и так далее) в исключающем иммунный ответ окружении заболевания (таком как TME) путем разблокирования и восстановления доступа и цитотоксических эффекторных функций эффекторных Т-клеток. Такие эффекты ингибирования TGFβ могут дополнительно обеспечивать долговременную иммунологическую память, опосредуемую, например, CD8+ Т-клетками.

[268] Неограничивающие примеры связанных с TGFβ показаний включают: фиброз, включая фиброз органов (например, фиброз почек, фиброз печени, фиброз миокарда/сердечно-сосудистый фиброз, фиброз мышц, фиброз кожи, фиброз матки/эндометриоз и фиброз легких), склеродермию, синдром Альпорта, рак (включая, но без ограничения, раки крови, такие как лейкоз, миелофиброз, множественная миелома, рак толстой кишки, рак почки, рак молочной железы, злокачественная меланома, глиобластома), связанный с солидными опухолями фиброз (например, раковую десмоплазию, такую как десмопластическая меланома, связанная с раком поджелудочной железы десмоплазия и десмоплазия карциномы молочной железы), стромальный фиброз (например, стромальный фиброз молочной железы), индуцированный облучением фиброз (например, синдром лучевого фиброза), облегчение быстрого гемопоэза после химиотерапии, заживление костей, заживление ран, деменцию, миелофиброз, миелодисплазию (например, миелодиспластические синдромы или MDS), почечную недостаточность (например, терминальную стадию почечной недостаточности или ESRD), одностороннюю обструкцию мочеточника (UUO), потерю и/или дегенерацию зубов, синдромы эндотелиальной пролиферации, астму и аллергию, желудочно-кишечные нарушения, анемию старения, аневризму аорты, орфанные показания (такие как синдром Марфана и болезнь Камурати-Энгельмана), ожирение, диабет, артрит, множественный склероз, мышечную дистрофию (например, миотоническую мышечную дистрофию, мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Беккера, конечностно-поясную мышечную дистрофию, плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию, врожденную мышечную дистрофию, окулофарингеальную мышечную дистрофию, дистальную мышечную дистрофию и мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса), боковой амиотрофический склероз (ALS), болезнь Паркинсона, остеопороз, остеоартрит, остеопению, метаболические синдромы, нарушения питания, атрофию органов, хроническую обструктивную болезнь легких (COPD) и анорексию.

[269] Связанные с TGFβ показания могут также включать состояния, при которых главный комплекс гистосовместимости (MHC) класса I удален или дефицитен (например, из-за понижающей регуляции). К таким состояниям относятся генетические нарушения, при которых повреждены один или несколько компонентов MHC-опосредованной сигнализации, а также состояния, при которых экспрессия MHC изменена другими факторами, такими как рак, инфекции, фиброз и прием лекарственных средств.

[270] Например, понижающая регуляция MHC I в опухоли связана с ускользанием опухоли от иммунного надзора. Действительно, в злокачественных клетках нередко обнаруживаются стратегии иммунного ускользания, направленные на то, чтобы избежать

распознавания Т-клетками, включая потерю экспрессии опухолевого MHC класса I. Было замечено, что иммунное ускользание опухоли оказывает негативное влияние на клинический исход иммунотерапии рака, включая лечение антителами, блокирующими молекулы иммунных контрольных точек (рассмотрено, например, в документе Garrido *et al.*, (2017) *Curr Opin Immunol* 39: 44-51. "The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy", который включен в настоящий документ посредством ссылки). Таким образом, изоформно-селективные ингибиторы TGFβ1, охватываемые настоящим изобретением, можно вводить или в виде монотерапии, или в сочетании с другой терапией (такой как ингибитор контрольных точек, химиотерапия, лучевая терапия и так далее) для освобождения или усиления противоракового иммунитета и/или усиления реагирования на другую терапию или ее эффективности.

[271] Понижающая регуляция белков MHC класса I также связана с некоторыми инфекционными заболеваниями, включая вирусные инфекции, такие как HIV. Смотри, например, документ Cohen *et al.,* (1999) *Immunity* 10(6): 661-671. "The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK Cells", который включен в настоящий документ посредством ссылки. Таким образом, изоформно-селективные ингибиторы TGFβ1, охватываемые настоящим изобретением, можно вводить или в виде монотерапии, или в сочетании с другой терапией (такой как противовирусная терапия, терапия ингибиторами протеазы и так далее) для освобождения или усиления иммунитета хозяина и/или усиления реагирования на другую терапию или ее эффективности.

Фиброзные состояния

[272] В ответ на повреждение ткани из-за физического повреждения/травмы, воздействия токсических веществ и/или инфекции начинается естественный репаративный процесс, в котором участвуют несколько типов клеток, включая фибробласты, несколько различных типов иммунных клеток и резидентные эпителиальные и эндотелиальные клетки. Однако, если его проигнорировать, этот процесс может приводить к чрезмерному накоплению внеклеточного матрикса (ECM) и фиброзу, что, в свою очередь, может приводить к прогрессирующей потере функции ткани и органной недостаточности (Caja *et al.*, *Int. J. Mol. Sci*. 2018, 19, 1294).

[273] Фиброз может возникать в нескольких различных органах, включая легкие, почки, печень, сердце и кожу. Независимо от органа фиброзная реакция характеризуется воспалением, изменением эпителиально-мезенхимальных взаимодействий и пролиферацией фибробластов. Одним из признаков фиброза является дифференцировка фибробластов в миофибробласты, которые в значительной степени способствуют

дисрегуляции ECM. Однако предполагают, что миофибробласты поступают также из других клеточных источников (например, эндотелиальных клеток, эпителиальных клеток и мезенхимальных стволовых клеток (Kim, K.K. *et al.*, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2017; Okabe, H. *Histol. Histophathol.*, 2016, 31, 141-148; и Li, C *et al.*, *Nat Commun.*, 2016, 7, 11455). Кроме того, важную роль в процессе играют иммунные клетки, секретируя цитокины и хемокины, которые способствуют дифференцировке миофибробластов, стимулируют депонирование ECM и рекрутируют дополнительные иммунные клетки в поврежденную ткань (Caja *et al.*, *Int. J. Mol. Sci*. 2018, 19, 1294).

[274] Аналогично активации фибробластов в фиброзной ткани, активация рак-ассоциированных фибробластов (CAF) может происходить в опухолевой среде, которая продуцирует избыточное количество ECM. ECM обеспечивает структуру для инфильтрации других клеток (например, проонкогенных иммунных клеток) и субстрат для миграции клеток. В других случаях избыточный ECM может выступать в качестве барьера против противоопухолевых иммунных клеток.

[275] TGFβ считается центральным оркестратором фиброзного ответа. TGFβ может способствовать дифференцировке миофибробластов, рекрутировать иммунные клетки и влиять на дифференцировку эпителиальных и эндотелиальных клеток. В частности, TGFβ повышающе регулирует продукцию ECM и белков базальной мембраны, таких как фибронектин, коллаген, ламинин, остеопонтин, тенасцин, эластин, декорин. TGFβ-индуцированная дифференцировка миофибробластов может приводить к дополнительному депонированию белков ECM, секреции матриксной металлопротеиназы (MMP) и пролиферации миофибробластов (Fabregat *et al.*, *FEBS J.* 2016, 283, 2219-2232; Meng *et al.*, *Nat. Rev. Nephrol.* 2016, 12, 325-338; и Kulkarni *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2016, 54, 751-760). Кроме того, TGFβ опосредует фенотипические изменения, влияющие на сократительные белки и коллаген I в гладкомышечных клетках сосудов (VSCM) и может активировать миофибробласты и другие стромальные клетки для усиления синтеза белков, сшивающих коллаген, таких как лизилоксидазное (LOX) семейство матрикс-ремоделирующих ферментов (Busnadiego *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 2013, 33, 2388-2401). Кроме того, было показано, что TGFβ регулирует как EMT, так и EndMT, что способствует дифференцировке профибротических типов клеток, таких как миофибробласты и CAF. Кроме того, было показано, что TGFβ индуцирует эпителиальный апоптоз, который может способствовать фиброзу легких и печени помимо других тканей (Barbas-Filho *et al.*, *J. Clin. Pathol.* 2001, 54, 132-138; и Wang *et al.*, *Dev. Dyn.* 2017, 247, 492-508).

[276] Как собственные, так и рекрутированные макрофаги играют важную роль в реагировании на повреждение и восстановление тканей. Однако при определенных

сигналах они могут стать профибротическими. Было также показано, что TGFβ, помимо других цитокинов, активирует M2-макрофаги, которые являются провоспалительными. При активации эти макрофаги секретируют свои собственные цитокины, в том числе TGFβ, компоненты ECM, ангиогенные факторы и хемотаксические факторы. Было показано, что M2-макрофаги существенны для управляемого TGFβ фиброза легких (Murray *et al.*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2011, 43, 154-162).

[277] Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, применяют в лечении фиброза (например, фиброзных показаний, фиброзных состояний) у субъекта. Подходящие ингибиторы для осуществления настоящего изобретения включают антитела и/или композиции согласно настоящему изобретению, которые можно применять для изменения или ослабления фиброза. Более конкретно, такие антитела и/или композиции являются селективными антагонистами TGFβ1, которые способны нацеливаться на TGFβ1, презентируюемый презентирующими молекулами различных типов.

[278] Антитела, нацеленные на TGFβ, уменьшают фиброз в многочисленных доклинических моделях. Такие антитела и/или соединения на основе антител включают LY2382770 (Eli Lilly, Indianapolis, IN, доступный, например, от Creative Biolabs, CAT#: TAB-605CL). Также включены антитела, описанные в патентах США №№ US 6492497, US 7151169, US 7723486 и US 8383780, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте. Антагонисты TGFβ предшествующего уровня техники включают, например, средства, которые нацелены на интегрин-зависимую активацию TGFβ и блокируют ее.

[279] Однако данные свидетельствуют о том, что такие средства предшествующего уровня техники могут не опосредовать изоформно-специфичное ингибирование и могут вызывать нежелательные эффекты, непреднамеренно блокируя нормальную функцию TGFβ2 и/или TGFβ3. Действительно, представленные в настоящем документе данные подтверждают это мнение. Нормальные (непораженные) ткани легких содержат относительно низкие, но измеримые уровни TGFβ2 и TGFβ3 и значительно меньше TGFβ1. Для сравнения, при определенных болезненных состояниях, таких как фиброз, TGFβ1 преимущественно подвергается положительной регуляции по сравнению с другими изоформами. Предпочтительно, антагонисты TGFβ для применения в лечении таких состояний проявляют свое ингибирующее действие только в отношении индуцируемой заболеванием или ассоциированной с заболеванием изоформы, сохраняя при этом функцию других изоформ, которые в норме экспрессируются для опосредования тонической сигнализации в ткани. Ингибиторы предшествующего уровня техники (LY2109761 (CAS №

700874-71-1, Eli Lilly), низкомолекулярный антагонист рецептора TGFβ и моноклональное антитело, нацеленное на интегрин $\alpha_V\beta_6$), как показано, ингибируют тоническую сигнализацию TGFβ вниз по каскаду в непораженных крысах BAL, что повышает вероятность того, что эти ингибиторы могут вызывать нежелательные побочные эффекты. Альтернативно или дополнительно, средства, которые нацелены на интегрин-зависимую активацию TGFβ и блокируют ее, могут быть способны блокировать только подмножество интегринов, ответственных за ассоциированную с заболеванием активацию TGFβ1, из множества типов интегринов, которые экспрессируются клетками различных типов и играют роль в патогенезе. Кроме того, даже если такие антагонисты могут селективно блокировать интегрин-опосредованную активацию изоформы TGFβ1, они могут быть неэффективными в блокировании активации TGFβ1, инициируемой другими способами, например протеаза-зависимой активации. Напротив, изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, направлены на предотвращение стадии активации TGFβ1 независимо от конкретного способа активации при сохранении изоформной селективности. Предпочтительно, изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab46 или сконструированную молекулу, содержащую его антигенсвязывающий фрагмент.

[280] Кроме того, предполагается, что изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1, которые предпочтительно ингибируют матрикс-ассоциированные, а не клеточно-ассоциированные антигенные комплексы (то есть, проявляют предпочтение контекста) могут предлагать терапевтическое преимущество в определенных клинических ситуациях. Например, ингибиторы TGFβ1 (которые нацелены на все четыре антигенных комплекса), могут усиливать иммунную активацию за счет нацеливания на клеточно-ассоциированный TGFβ1 (например, GARP-TGFβ1, который экспрессируется на регуляторных Т-клетках). Иммунная активация может быть невыгодной для некоторых пациентов, например пациентов с аутоиммунным заболеванием или с риском развития сепсиса. Соответственно, антитела с предпочтением контекста можно применять для лечения заболеваний, связанных с матрикс-ассоциированными комплексами TGFβ1 (например, фиброза), при минимизации иммунной активации.

[281] Как рассмотрено выше, ингибирующая активность в отношении TGFβ3 может быть нежелательной особенностью ингибиторов TGFβ для использования в качестве терапии в ситуациях, когда фиброз представляет собой проблему. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ является селективным по отношению к изоформе TGFβ1 в том смысле, что он не ингибирует TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ является селективным по

отношению к изоформе TGFβ1 в том смысле, что он не ингибирует TGFβ2. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ является селективным по отношению к изоформе TGFβ1 в том смысле, что он не ингибирует TGFβ2 и TGFβ3.

[282] Кроме того, предполагается, что изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ3 могут предоставлять терапевтическую пользу при определенных болезненных состояниях. Например, некоторые фиброзные заболевания, подлежащие лечению ингибитором TGFβ1, могут также быть TGFβ3-положительными (то есть фиброзная ткань TGFβ1+/TGFβ3+), характеризующимися тем, что пораженная ткань (например, фиброзная ткань) экспрессирует обе изоформы. Соответственно, настоящее изобретение относится к применению изоформно-селективного ингибитора TGFβ1 в сочетании с изоформно-селективным ингибитором TGFβ3 в лечении таких состояний (то есть фиброзной ткани TGFβ1+/TGFβ3+). Такие ингибиторы TGFβ3 могут быть не зависящими от контекста или с предпочтением контекста.

[283] Фиброзные показания, для которых можно терапевтически применять антитела и/или композиции согласно настоящему изобретению, включают, но без ограничения, легочные показания (например, идиопатический фиброз легких (IPF), хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), аллергическую астму, острое повреждение легких, эозинофильный эзофагит, легочную артериальную гипертензию и химическое повреждение газом), почечные показания (например, диабетический гломерулоклероз, фокально-сегментарный гломерулоклероз (FSGS), хроническую болезнь почек (CKD), фиброз, связанный с трансплантацией почки и хроническим отторжением, IgA-нефропатию, диабетическую болезнь почек (DKD) и гемолитико-уремический синдром), фиброз печени (например, связанный с неалкогольным стеатогепатитом (NASH) или вызванный им, хронический вирусный гепатит, паразитемию, врожденные нарушения метаболизма, токсин-опосредованный фиброз, такой как алкогольный фиброз, неалкогольный стеатогепатит-гепатоклеточную карциному (NASH-HCC), первичный билиарный цирроз и склерозирующий холангит), сердечно-сосудистый фиброз (например, кардиомиопатию, гипертрофическую кардиомиопатию, атеросклероз и рестеноз), системный склероз, фиброз кожи (например, фиброз кожи при системном склерозе, диффузный кожный системный склероз, склеродермию, патологическое рубцевание кожи, келоид, послеоперационное рубцевание, хирургию коррекции рубца, индуцированное облучением рубцевание и хронические раны), связанные с глазами состояния, такие как субретинальный фиброз, синдром увеита, увеит, связанный с идиопатическим забрюшинным фиброзом, фиброз экстраокулярных мышц, заболевания глаз, связанные с главным комплексом гистосовместимости (MHC класса I) или антигенами

гистосовместимости, субретинальный фиброз при макулярной дегенерации (например, возрастной макулярной дегенерации), и раки или вторичный фиброз (например, миелофиброз, рак головы и шеи, острый мегакариобластный лейкоз M7 и мукозит). Другие заболевания, нарушения или состояния, связанные с фиброзом (включая дегенеративные нарушения), которые можно лечить с использованием соединений и/или композиций согласно настоящему изобретению, включают, но без ограничения, аденомиоз, эндометриоз, синдром Марфана, синдром жесткой кожи, склеродермию, ревматоидный артрит, фиброз костного мозга, болезнь Крона, язвенный колит, системную красную волчанку, мышечную дистрофию (такую как DMD), болезнь Паркинсона, ALS, контрактуру Дюпюитрена, болезнь Камурати-Энгельмана, рубцевание нервов, деменцию, пролиферативную витреоретинопатию, повреждение роговицы, осложнения после дренажной хирургии глаукомы и множественный склероз (MS). Многие такие фиброзные показания также связаны с воспалением пораженной ткани(ей), что указывает на участие иммунного компонента. Такое воспаление может сопровождаться аберрантными популяциями иммунных клеток, например увеличением количества клеток Th17, уменьшением количества клеток Treg и/или и тем, и другим. В каждом случае у пораженного пациента может наблюдаться увеличение соотношения клеток Th17/Treg.

[284] Согласно некоторым вариантам осуществления фиброзные показания, которые можно лечить с помощью композиций и/или способов, описанных в настоящем документе, включают фиброз органов, такой как фиброз легкого (например, IPF), фиброз почек (например, фиброз, связанный с CKD), фиброз печени (например, связанный с NASH или обусловленный им), фиброз сердца или сердечных тканей, фиброз кожи (например, склеродермию), фиброз матки (например, эндометрия, миометрия), фиброз мышц (например, скелетных мышц) и фиброз костного мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления такая терапия может уменьшать или отсрочивать потребность в трансплантации органов у пациентов. Согласно некоторым вариантам осуществления такая терапия может увеличивать выживаемость пациентов.

[285] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1, такие как раскрытые в настоящем документе, могут отсрочивать или уменьшать потребность в трансплантации органов. Согласно некоторым вариантам осуществления трансплантация органа представляет собой трансплантацию легкого, трансплантацию печени или трансплантацию почки.

[286] Для лечения IPF пациенты, которым может помочь лечение, включают пациентов с семейным IPF и пациентов со спорадическим IPF. Введение терапевтически эффективного количества изоформно-специфичного ингибитора TGFβ1 может уменьшать

накопление миофибробластов в тканях легких, уменьшать отложения коллагена, уменьшать симптомы IPF, улучшать или поддерживать функцию легких и продлевать выживаемость. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор блокирует активацию ECM-ассоциированного TGFβ1 (например, proTGFβ1/латентного TGFβ1, презентируемого LTBP1/3) в фиброзном окружении IPF. Ингибитор может, необязательно, дополнительно блокировать активацию ассоциированного с макрофагами TGFβ1 (например, proTGFβ1/латентного TGFβ1, презентируемого LRRC33), например с альвеолярными макрофагами. В результате ингибитор может подавлять высвобождение фибронектина и другие связанные с фиброзом факторы. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор блокирует активацию звездчатых клеток печени.

[287] Согласно некоторым вариантам осуществления пациент с IPF, которому может помочь лечение с помощью композиций, описанных в настоящем документе (например, с помощью терапевтически эффективного количества изоформно-специфичного ингибитора TGFβ1), является субъектом, который является кандидатом на трансплантацию легкого. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект с IPF, которому может помочь лечение с помощью композиций, описанных в настоящем документе (например, с помощью терапевтически эффективного количества изоформно-специфичного ингибитора TGFβ1), является субъектом, который не является кандидатом на трансплантацию легкого.

[288] Согласно некоторым вариантам осуществления пациенту с IPF вводят композицию, описанную в настоящем документе, в комбинации со вторым средством. Согласно некоторым вариантам осуществления второе средство представляет собой одно или несколько из пирфенидона, нинтеданиба и/или N-ацетилцистеина. Согласно некоторым вариантам осуществления пациенту с IPF вводят терапевтически эффективное количество изоформно-специфичного ингибитора TGFβ1 в комбинации с одним или несколькими из пирфенидона, нинтеданиба и/или N-ацетилцистеина.

[289] Хорошо известно, что активация звездчатых клеток печени (HSC) является основным фактором фиброза при повреждении печени. В этом процессе покоящиеся клетки, запасающие витамин А, трансдифференцируются в пролиферативные фиброгенные миофибробласты (основной источник накопления белка внеклеточного матрикса (ECM)). Однако было показано, что этот процесс опосредуется многими различными путями, включая аутофагию, стресс эндоплазматического ретикулума, окислительный стресс, метаболизм ретинола и холестерина, эпигенетику и сигналы, опосредуемые рецепторами. Кроме того, было также показано, что воспалительные клетки, включая макрофаги, гепатоциты, синусоидальные эндотелиальные клетки печени, клетки-естественные киллеры, Т-клетки-естественные киллеры, тромбоциты и В-клетки, модулируют активацию

HSC (Tsuchida and Friedman, N*ature Reviews Gastroenterology & Hepatology* volume 14, pages 397–411 (2017)). Только в одном конкретном примере Seki *et al.* продемонстрировали, что активация TLR4 (который распознает LPS, презентируемый бактериями) приводит к повышающей регуляции секреции хемокинов и индуцирует хемотаксис клеток Купфера, а также повышает чувствительность HSC к TGFβ-индуцированным сигналам и обеспечивает неограниченную активацию клеток Купфера (Seki *et al., Nature Medicine* volume 13, pages 1324–1332 (2007)).

[290] Хорошо известно, что воспаление играет ключевую роль в развитии и прогрессировании фиброза печени. В частности, повреждение печени приводит к воспалению и рекрутированию моноцитов/макрофагов (а также лимфоцитов, эозинофилов и плазматических клеток), которые продуцируют профибротические факторы, включая TGFβ. Кроме того, исследования показывают, что как тканевые резидентные макрофаги печени (клетки Купфера), так и происходящие из костного мозга рекрутированные макрофаги играют важную роль в прогрессировании фиброза печени, и что путь TGFβ может способствовать поляризации и профибротическим функциям макрофагов во время фиброза печени. Действительно, было показано, что как клетки Купфера, так и рекрутированные макрофаги могут активировать HSC и индуцировать их трансдифференцировку в миофибробласты с помощью паракринных механизмов, включая TGFβ. Миофибробласты, в свою очередь, продуцируют и депонируют компоненты ECM, что приводит к фиброзу (Fabregat and Caballero-Diaz, *Front Oncol.* 2018; 8: 357).

[291] Тем не менее, миофибробласты могут поступать и из других источников, включая портальные и резидентные фибробласты, происходящие из костного мозга фиброциты, эпителиальные клетки печени, подвергающиеся EMT, эндотелиальные клетки, подвергающиеся EndMT, и гладкомышечные клетки и перициты сосудов. Действительно, также было показано, что TGFβ регулирует как EndMT, так и EMT, что приводит к увеличению количества миофибробластов, которые вызывают фиброз печени. (Pardali *et al.*, *Int J Mol Sci.* 2017 Oct; 18(10): 2157). Соответственно, нацеливание на TGFβ является привлекательной терапевтической мишенью для лечения фиброзных состояний.

[292] Было показано, что TGFβ играет много ролей в фиброзе печени и прогрессировании заболевания. Например, было показано, что TGFβ отвечает за активацию HSC в миофибробласты. Также было показано, что TGFβ опосредует эпителиальный-мезенхимальный переход (EMT) в гепатоцитах, что может способствовать увеличению популяции миофибробластов. Более того, было показано, что TGFβ индуцирует изменения пластичности опухолевых клеток (Fabregat and Caballero-Diaz, *Front Oncol.* 2018; 8: 357).

[293] Хотя TGFβ может быть обнаружен во многих различных клеточных источниках в фиброзном и/или опухолевом микроокружении, что позволяет предположить презентацию TGFb несколькими различными презентирующими молекулами (например, LTBP1, LTBP3, GARP и/или LRRC33), в некоторых ситуациях может быть полезно нацеливаться только на конкретные источники TGFβ. Например, Henderson *et al.* показали, что делеция интегрина αv в HSC защищала мышей от CCL_4-индуцированного фиброза печени (Henderson *et al.*, *Nat. Med.* 2013, 19, 1617-16-24). Поскольку интегрины являются основными активаторами LTBP-презентируемого TGFβ, этот результат позволяет предположить, что нацеливания на LTBP-презентируемый TGFβ может быть в некоторых ситуациях достаточно для лечения фиброза. Однако, поскольку иммунные клетки играют важную роль в фиброзном ответе, могут быть полезными ингибиторы TGFβ, нацеленные на TGFβ, презентируемый в большинстве или во всех комплексах презентирующая молекула-TGFβ.

[294] В последние годы лечение фиброза печени стало предметом особого внимания из-за его растущей распространенности во всем мире. Например, неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) связана с метаболическими нарушениями, такими как ожирение, резистентность к инсулину, гипергликемия натощак, дислипидемия и измененный профиль адипокинов. NAFLD характеризуется избыточным накоплением липидов в гепатоцитах и представляет собой спектр заболеваний, прогрессирующих от стеатоза печени (накопление капель липидов/жира в гепатоцитах) до неалкогольного стеатогепатита (NASH), фиброза печени и, в конечном итоге, цирроза в наиболее тяжелых случаях. NASH с фиброзом или циррозом увеличивает риск развития гепатоклеточной карциномы (HCC) (Starley BQ, *et al.*, *Hepatology* 2010; 51: 1820–1832). Предполагается, что прогрессирование от стеатоза до NASH регулируется по модели «многократного попадания», причем первым попаданием является резистентность к инсулину и метаболическое нарушение, которые приводят к стеатозу печени, за чем следует окислительный стресс, опосредованное провоспалительными цитокинами повреждение гепатоцитов, изменение распределения липидов и гепатотоксичность, опосредованная свободными жирными кислотами, аномальная внутрипеченочная нагрузка холестерином, гиперинсулинемия, гиперлептинемия и гипоадипонектинемия (Tilg H, Moschen AR, *Hepatology* 2010; 52: 1836–1846; и Yilmaz Y., *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36: 815–823).

[295] Существует множество моделей на животных, разработанных для изучения фиброза печени. Например, было показано, что диета с высоким содержанием жиров у мышей имитирует как гистопатологию, так и патогенез NAFLD у человека. Более того, некоторые генетические модели, такие как модели на мышах *db*/*db* и *ob*/*ob*, также

демонстрируют признаки метаболического синдрома и NAFLD человека. Существуют также модели на животных для изучения NASH, которые в основном состоят из различных моделей, индуцированных диетой, включая без ограничения диету с дефицитом метионина и холина (MCD), диету с высоким содержанием холестерина (HCD), диету с дефицитом холина и высоким содержанием жиров (CDHFD), диету с дефицитом холина и дефицитом L-аминокислот, диету с дефицитом холина и дефицитом L-аминокислот + тетрахлорид углерода, диету с высоким содержанием жиров + стрептозотоцин, диету с высоким содержанием жиров и высоким содержанием холестерина (HFHC), диету с высоким содержанием фруктозы (HFD) и диету с высоким содержанием фруктозы и высоким содержанием жиров (HFHF). Генетические модели на мышах для изучения NASH включают, но без ограничения, мышей foz/foz, мышей с гепатоцит-специфичным дефицитом PTEN, мышей Db/db + диэтилнитрозамин (DEN) и мышей *db*/*db* + MCD. Подробная информация обо всех этих моделях, включая плюсы и минусы каждой из них, приведена в документе Jennie Ka Ching Lau *et al.*, *J Pathol* 2017; **241:** 36–44; содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

[296] К другим моделям, применимым для тестирования эффективности изоформно-специфичных ингибиторов TGFβ при фиброзе печени, относятся модель с тетрахлоридом углерода (CCl_4) и модель фиброза печени на основе диеты с дефицитом холина и высоким содержанием жиров (CDHFD). К другим моделям, применимым для тестирования эффективности изоформно-специфичных ингибиторов TGFβ при фиброзе печени относится модель с перевязкой желчных протоков (BDL) (смотри, например, Tag *et al.*, *J Vis Exp.* 2015; (96): 52438).

[297] Как рассмотрено в настоящем документе, на основе данных, свидетельствующих о возможности вредного воздействия ингибирования TGFβ2/3, ингибирующая активность в отношении TGFβ2 и/или TGFβ3 может быть нежелательным свойством ингибиторов TGFβ для применения в качестве терапии в ситуациях, когда фиброз представляет собой проблему. Согласно некоторым вариантам осуществления предпочтительные ингибиторы для применения в лечении таких состояний печени как NAFLD и NASH являются селективными по отношению к изоформе TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ является селективным по отношению к изоформе TGFβ1 в том смысле, что он не ингибирует TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ является селективным по отношению к изоформе TGFβ1 в том смысле, что он не ингибирует TGFβ2. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ является селективным по отношению к изоформе TGFβ1 в том смысле, что он не ингибирует TGFβ2 и TGFβ3.

[298] Изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1, такие как представленные в настоящем документе, можно применять для лечения фиброзных состояний печени, таких как ожирение печени (например, неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) и неалкогольный стеатогепатит (NASH)). Печень с ожирением может быть или не быть воспаленной. Воспаление печени из-за ожирения печени (то есть, стеатогепатит) может перерастать в рубцевание (фиброз), которое затем часто прогрессирует в цирроз (рубцевание, которое искажает структуру печени и ухудшает ее функцию). Таким образом, ингибитор можно использовать для лечения таких состояний. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор блокирует активацию ECM-ассоциированного TGFβ1 (например, proTGFβ1/латентного TGFβ1, презентируемого LTBP1/3) в фиброзном окружении печени. Ингибитор может, необязательно, дополнительно блокировать активацию ассоциированного с макрофагами TGFβ1 (например, proTGFβ1/латентного TGFβ1, презентируемого LRRC33), например с клетками Купфера (также известными как звездчатые макрофаги), а также инфильтрирующими происходящими от моноцитов макрофагами и MDSC. В результате ингибитор может подавлять факторы, ассоциированные с фиброзом (например, фиброзные маркеры, описанные в настоящем документе). Введение ингибитора субъекту с такими состояниями может уменьшать один или несколько симптомов, предотвращать или замедлять прогрессирование заболевания, уменьшать или стабилизировать накопление жира в печени, уменьшать количество ассоциированных с заболеванием биомаркеров (таких как фрагменты сывороточного коллагена), уменьшать рубцевание печени, уменьшать жесткость печени и/или иным образом вызывать клинически значимый результат в популяции пациентов, получавших ингибитор, по сравнению с контрольной популяцией, не получавшей ингибитор. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество ингибитора может способствовать как уменьшению жира в печени, так и уменьшению фиброза (например, рубцевания) у пациентов с NASH. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество ингибитора может способствовать уменьшению фиброза по меньшей мере на одну стадию без ухудшения течения 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.

[299] Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество ингибитора может нормализовывать по сравнению с контролем уровни нескольких воспалительных или фиброзных сывороточных биомаркеров при оценке после начала терапии, например через 12-36 недель. Согласно некоторым вариантам осуществления

воспалительные или фиброзные биомаркеры можно применять для оценки тяжести NAFLD (путем измерения уровней стеатоза печени), отбора пациентов для лечения и/или мониторинга прогрессирования заболевания или ответа на лечение. Например, биомаркеры крови и панели могут включать, но без ограничения:

i) индекс жирности печени (ИМТ, окружность талии, триглицериды сыворотки и гаммаглутамилтрансфераза (GGT);

ii) индекс стеатоза печени (соотношение сывороточная аспартатаминотрансфераза (AST):аланинаминотрансфераза (ALT), ИМТ, пол и наличие сахарного диабета);

i) показатель жира в печени при NAFLD (сывороточная ALT, холестерин HDL, триглицериды, гемоглобин A_{1c} и количество лейкоцитов);

ii) SteatoTest (BioPredictive) (уровни в сыворотке общего билирубина, GGT, α2-макроглобина, гаптоглобина, ALT, аполипопротеина AI, общего холестерина, триглицеридов, глюкозы (с поправкой на возраст и пол) и ИМТ); и

iii) гребневая шкала NAFLD (сывороточные уровни ALT, холестерин HDL, триглицериды, гемоглобин A_{1c}, количество лейкоцитов и данные о сопутствующих заболеваниях (и наличии гипертензии)).

[300] Согласно некоторым вариантам осуществления можно применять биомаркеры визуализации для оценки уровней стеатоза печени. Например, к биомаркерам визуализации могут относиться, но без ограничения, ультрасонография, контролируемый параметр затухания (CAP), измеренная с помощью МРТ протонная плотность жировой фракции (MRI-PDFF) и магнитно-резонансная спектроскопия (MRS).

[301] Биопсия печени в настоящее время является стандартом для диагностики NASH, однако вариабельность среди патологоанатомов ограничивает эффективность такого способ диагностики. Соответственно, можно применять алгоритм ингибирования прогрессирования ожирения печени (FLIP) (содержащий показатели гистологического стеатоза, активности и фиброза) для улучшения согласованности диагностики NASH с помощью биопсии. Кроме того, многие неинвазивные биомаркеры также могут быть полезны для диагностики и мониторинга заболевания. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления можно применять воспалительные или фиброзные биомаркеры для оценки тяжести NASH, отбора пациентов для лечения и/или мониторинга прогрессирования заболевания или ответа на лечение. Биомаркеры крови могут включать:

i) маркеры апоптоза, такие как фрагменты CK18, общий цитокератин и sFAS;

ii) воспалительные маркеры, такие как CRP, TNF, IL-8 и CXCL10;

iii) продукты окисления липидов, такие как 11-HETE, 9-HODE, 13-HODE, 12-оксо-ODE, LA-13-HODE (oxNASHscore) и 11,12-diHETrE;

iv) лизосомальные ферменты, такие как катепсин D; и

v) комбинированные панели, такие как NASHTest (BioPredictive) и панель диагностики NASH (содержащая наличие сахарного диабета, пол, ИМТ и сывороточные уровни триглицерида, фрагментов CK18 и общего CK18).

[302] Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркеры и соответствующие панели можно применять для диагностики уровней фиброза и/или цирроза, отбора пациентов для лечения и/или мониторинга прогрессирования заболевания или ответа на лечение. Например, неинвазивные тесты на фиброз и цирроз печени включают, но без ограничения, соотношение AST:ALT, индекс отношения AST:тромбоциты, индекс фиброза-4 (возраст, AST, ALT и количество тромбоцитов), показатель фиброза при NAFLD (возраст, ИМТ, нарушение уровня глюкозы натощак и/или диабет, AST, ALT, количество тромбоцитов и альбумин), показатель BARD (AST, ALT, ИМТ и диабет).

[303] Также могут быть полезны специфические маркеры и панели фиброза, которые включают, но без ограничения, гиалуроновую кислоту; PIIPNP; Pro-C3; TIMP1; ламинин; панель генерализированного фиброза печени (ELF) (PIINP, гиалуроновая кислота, TIMP1); FibroTest (GGT, общий билирубин, α_2m, аполипопротеин AI и гаптоглобин); и FibroMeter NAFLD (масса тела, протромбиновый индекс, ALT, AST, ферритин и глюкоза натощак). Биомаркеры визуализации для фиброза печени могут включать, но без ограничения, FibroScan (TE), точечную сдвиговолновую эластографию (pSWE) (также известную как импульс силы акустического излучения (ARFI)), 2D-3D SWE, магнитно-резонансную эластографию (MRE) и мультипараметрическую MPT.

[304] Согласно некоторым вариантам осуществления можно измерять сывороточные уровни ферментов печени, таких как щелочная фосфатаза (ALP), аланинаминотрансфераза (ALT), аспартатаминотрансфераза (AST) или G-глутамилтрансфераза (GGT) в качестве индикаторов фиброза в печени.

[305] Согласно некоторым вариантам осуществления для оценки риска и тяжести NAFLD можно применять генетические и геномные биомаркеры, которые включают оценку различных SNP, внеклеточных ncRNA и miRNA. Всесторонний обзор известных генетических и геномных биомаркеров, а также рассмотренных выше биомаркеров крови, панелей, биомаркеров визуализации и тестов приведен в документе VWS Wong *et al.*, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018 Aug;15(8):461-478; содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

[306] Согласно некоторым вариантам осуществления у пациентов с NASH, изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1 можно вводить пациентам, получающим

одну или несколько дополнительных терапий, включая, но без ограничения, ингибиторы миостатина, которые обычно могут усиливать регуляцию метаболизма у пациентов с клиническими проявлениями метаболического синдрома, включая NASH и NAFLD. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[307] Согласно некоторым вариантам осуществления у пациентов с NASH изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1 можно вводить пациентам, получающим ингибитор ацетил-КоА-карбоксилазы (ACCi) (например, фирсокостат (также известен как GS-0976) или PF-05221304). Другие терапевтические средства, которые могут быть полезны в комбинации с улучшенными изоформно-специфичными ингибиторами TGFβ1, описанными в настоящем документе, включают, но без ограничения, агонисты или аналоги рецептора GLP-1 (например, семаглутид), агонисты фарнезоидного X-рецептора (FXR) (например, GS-9674; также известен как цилофексор), ингибиторы ASK1 (например, селонсертиб); обетихолевую кислоту, агонисты PPAR (например, GFT505; также известен как элафибранор); нитазоксанид, ингибиторы кетогексокиназы (KHK) (например, PF-06835919); и/или ингибиторы диацилглицерол-О-ацилтрансферазы 2 (DGAT2) (например, PF-06865571). Согласно некоторым вариантам осуществления любое одно или несколько из вышеупомянутых терапевтических средств можно применять в комбинации с изоформно-специфичным ингибитором TGFβ1 согласно настоящему изобретению, например изоформно-специфичный ингибитор TGFβ1 в комбинации с агонистом FXR, ингибитором ACC и/или аналогом GLP-1.

[308] Согласно некоторым вариантам осуществления лечение с помощью изоформно-специфичных ингибиторов TGFβ1 отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами уменьшает количество печеночного жира, измеренное с помощью MRI-PDFF. Согласно некоторым вариантам осуществления уменьшение количества печеночного жира составляет по меньшей мере 20%, например ≥20%, ≥25%, ≥30%, ≥35%, ≥40%, ≥45% или ≥50%. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение с помощью изоформно-специфичных ингибиторов TGFβ1 отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами снижает ALT и/или GGT в сыворотке по меньшей мере на 20%, например ≥20%, ≥25%, ≥30%, ≥35%, ≥40%, ≥45% или ≥50%. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение с помощью изоформно-специфичных ингибиторов TGFβ1 отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами снижает синтез желчных кислот.

[309] Согласно некоторым вариантам осуществления у пациентов с NASH может быть прогрессирующий фиброз печени (стадия F3/F4). Согласно некоторым вариантам осуществления у таких пациентов стадия F3 прогрессирующего фиброза печени. Согласно некоторым вариантам осуществления у таких пациентов стадия F4 фиброза печени, характеризующаяся циррозом. Согласно некоторым вариантам осуществления у пациентов с NASH развивается гепатоклеточная карцинома и/или варикозное расширение вен пищевода или имеется риск их развития.

[310] Стадии фиброза при неалкогольной жировой болезни печени в соответствии с классификацией, разработанной Комитетом по патологии Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network, представлены ниже:

Таблица 20: Стадии фиброза

Проявление фиброза	Стадия фиброза
Перисинусоидальный или перипортальный фиброз	1
Легкий перисинусоидальный фиброз (зона 3)	1A
Умеренный перисинусоидальный фиброз (зона 3)	1B
Портальный/перипортальный фиброз	1C
Перисинусоидальный и портальный/перипортальный фиброз	2
Мостовидный фиброз	3
Цирроз	4

[311] Для обеспечения оценки различных гистологических признаков во время терапии и охвата всего спектра NAFLD Комитет по патологии NASH Clinical Research Network (CRN) провел тщательный одномерный и многомерный анализ ассоциаций между различными гистологическими признаками, наблюдаемыми при NASH, и диагнозом NASH по данным Комитета по патологии. Результатом стала шкала оценки как активности NASH (степень), так и депонирования коллагена вместе с архитектурным ремоделированием (стадия). Система оценки, шкала активности NASH (NAS), представляет собой невзвешенную сумму трех гистологических компонентов: стеатоза (0-3), лобулярного воспаления (0-3) и баллоннирующей дегенерации (0-2). Ее диапазон составляет от 0 до 8. NAS включает признаки активного повреждения, которые потенциально обратимы. Кроме того, была также разработана система стадирования фиброза Brunt *et al.* В системе NASH CRN показатель фиброза для стадии 1 подразделяется на легкий (1A) и плотный (1B) перисинусоидальный фиброз, тогда как стадию 1C определяют как портальный фиброз без сопутствующего перисинусоидального фиброза (рассмотрено в документе Stål, World *J.*

Gastroenterol. 2015 Oct 21; 21(39): 11077–11087, включенном в настоящий документ посредством ссылки).

[312] Изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1, такие как представленные в настоящем документе, можно применять для лечения фиброзных состояний почек, например заболеваний, характеризующихся накоплением внеклеточного матрикса (IgA-нефропатии, фокального и сегментарного гломерулосклероза, серповидного гломерулонефрита, волчаночного нефрита и диабетической нефропатии), при которых наблюдается значительно повышенная экспрессия TGFβ в клубочках и тубулоинтерстиции. При том, что гломерулярное и тубулоинтерстициальное депонирование двух компонентов матрикса, индуцируемых TGFβ, фибронектина EDA+ и PAI-1, значительно повышено при всех заболеваниях с накоплением матрикса, корреляционный анализ выявил тесную связь, прежде всего, с изоформой TGFβ1. Соответственно, изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1 применимы в качестве терапевтических средств для ряда гломерулярных нарушений человека, при которых TGFβ связан с патологическим накоплением внеклеточного матрикса. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[313] Согласно некоторым вариантам осуществления фиброзное состояние почек связано с хроническим заболеванием почек (CKD). CKD вызывается главным образом высоким кровяным давлением или диабетом и ежегодно уносит более миллиона жизней. Пациенты с CKD нуждаются в пожизненной медицинской помощи, которая варьируется от строгой диеты и приема лекарственных средств до диализа и трансплантации. Согласно некоторым вариантам осуществления терапия ингибиторами TGFβ1, описанная в настоящем документе, может уменьшать или отсрочивать потребность в диализе и/или трансплантации. Согласно некоторым вариантам осуществления такая терапия может уменьшать потребность в другом лечении (например, в дозировке, частоте). Согласно некоторым вариантам осуществления изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1 можно вводить пациентам, получающим одну или несколько дополнительных терапий, включая, но без ограничения, ингибиторы миостатина, которые обычно могут усиливать регуляцию метаболизма у пациентов с CKD.

[314] Фиброзные состояния, которые можно лечить с помощью ингибитора TGFβ1 согласно настоящему изобретению, включают состояния, связанные с фиброзом и/или хроническим воспалением. Такие состояния могут представлять собой нервно-мышечные нарушения, включая без ограничения мышечную дистрофию Дюшенна (DMD), и другие

генетические нарушения, такие как множественный склероз (MS) и кистозный фиброз (CF). Считается, что посредством ингибирования ассоциированного как с ECM, так и с иммунными клетками вариантов TGFβ1 ингибитор TGFβ1, такой как описанные в настоящем документе, подавляет прогрессирование фиброза и восстанавливает M1/M2-поляризацию макрофагов. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[315] Модели, применимые для изучения CKD и фиброза почек, включают без ограничения линии мышей NZB/W, MRL/*lpr* и BXSB, модели анти-GBM, модели анти-Thy1, модели нефрэктомии 5/6, радиационной нефропатии, пуромицин-аминонуклеозидного нефроза (PAN) и адриамициновой нефропатии, нефропатии фолиевой кислоты, нефропатии CyA, нефропатии соли DOCA, ВИЧ-ассоциированной нефропатии (HIVAN) на трансгенных мышах, крыс со спонтанной гипертензией (SHR), крыс Buffalo/mna, крыс Munich Wistar Frömter (MWF), одностороннюю обструкцию мочеточника (*UUO*), мышей с нокаутом Col4A (синдром Альпорта) (смотри Yang *et al., Drug Discov Today Dis Models.* 2010; 7(1-2): 13–19; содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки).

[316] Фиброз органов, который можно лечить с помощью способов, представленных в настоящем документе, включает сердечный (например, сердечно-сосудистый) фиброз. Согласно некоторым вариантам осуществления фиброз сердца связан с сердечной недостаточностью, например хронической сердечной недостаточностью (CHF). Согласно некоторым вариантам осуществления сердечная недостаточность может быть связана с с заболеваниями миокарда и/или метаболическими заболеваниями. Согласно некоторым вариантам осуществления изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1 можно вводить пациентам, получающим одну или несколько дополнительных терапий, включая, но без ограничения, ингибиторы миостатина у пациентов с сердечной дисфункцией, которая связана с фиброзом сердца и метаболическим нарушением. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[317] Генетические модели, применимые для изучения фиброза сердца, включают без ограничения мышей со специфичным к сердечным миоцитам FAK- KO, генетически модифицированных мышей с двойным KO (dKO) SR-BI / apoE, мышей с отсутствием синдекана-1, мышей со сверхэкспрессией EC-SOD, мышей с нокаутом PKC-δ.

Хирургические модели на мышах, применимые для изучения фиброза сердца, включают без ограничения перевязку коронарных артерий, модель ишемии-реперфузии (с открытой и закрытой грудной клеткой), модель хронической ишемии, модель ишемии-реперфузии с ишемическим прекондиционированием, модель Лангендорфа, поперечное сужение аорты (TAC), сужение восходящей аорты, сужение брюшной аорты, бандажирование легочной артерии, TAC с перевязкой дистальной левой передней коронарной артерии, модель аортокавальной фистулы (ACF) и модель аортальной недостаточности (смотри Rai *et al.*, *Mol Cell Biochem.* 2017 Jan; 424(1-2): 123–145; содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки).

[318] Согласно некоторым вариантам осуществления к фиброзным состояниям, которые можно лечить с помощью композиций и/или способов, описанных в настоящем документе, относится десмоплазия. Десмоплазия может возникать вокруг новообразования, вызывая плотный фиброз вокруг опухоли (например, десмопластическую строму), или рубцовой ткани в брюшной полости после абдоминальной хирургии. Согласно некоторым вариантам осуществления, десмоплазия связана со злокачественной опухолью. Из-за плотного образования, окружающего злокачественное образование, обычные противораковые терапевтические средства (например, химиотерапия) не могут эффективно проникать в раковые клетки для достижения клинического эффекта. Изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, можно применять для разрушения десмоплазии, так что фиброзное образование может быть ослаблено, чтобы усилить действие противораковой терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1 можно применять в качестве монотерапии (подробнее ниже).

[319] Согласно некоторым вариантам осуществления у пациента есть фиброзная солидная опухоль (например, десмоплазия), и его исключают или исключили из пула кандидатов на хирургическое вмешательство, так что данная фиброзная солидная опухоль, как полагают, является нерезектабельной или неоперабельной. Такой пациент может быть кандидатом на получение терапии ингибированием TGFβ1 согласно настоящему изобретению. Ингибитор TGFβ1 согласно настоящему изобретению может сделать опухоль операбельной или операбельной после введения, так что пациент может стать кандидатом на хирургическую резекцию.

[320] Для лечения пациентов с фиброзными состояниями субъекту вводят специфичные по отношению к изоформе TGFβ1 ингибиторы в количестве, эффективном для лечения фиброза. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их

производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент. 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 антитело, которое может блокировать активацию LTBP-опосредованного TGFβ1, локализованного (например, связанного) в ECM, и GARP-опосредованного TGFβ1, локализованного (например, связанного) на иммунных клетках. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой антитело, которое может блокировать активацию LTBP-опосредованного TGFβ1, локализованного в ECM, и LRRC33-опосредованного TGFβ1, локализованного (например, связанного) на моноцитах/макрофагах. Согласно некоторым вариантам осуществления LTBP представляет собой LTBP1 и/или LTBP3. Согласно некоторым вариантам осуществления может быть полезным нацеливание на TGFβ1, презентируемый LRRC33 на профибротических M2-подобных макрофагах в фиброзном микроокружении, и его ингибирование.

[321] Анализы, применимые для определения эффективности антител и/или композиций согласно настоящему изобретению в отношении изменения фиброза, включают без ограничения гистологические анализы для подсчета фибробластов и основные иммуногистохимические анализы, известные в данной области техники.

[322] Согласно некоторым вариантам осуществления циркулирующий фрагмент(ы) LAP можно использовать в качестве сывороточного маркера фиброгенеза. Смотри например, патент США № 8198412, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Заболевание, связанное с дисрегуляцией ECM

[323] Внеклеточный матрикс представляет собой секретируемую клетками сеть, которая окружает клетки и в основном состоит из протеогликанов и волокнистых белков, наиболее распространенным из которых является коллаген. Новые антитела, раскрытые в настоящем документе, можно применять в лечении заболеваний, связанных с дисрегуляцией внеклеточного матрикса. Заболевания, связанные с дисрегуляцией внеклеточного матрикса, обычно представляют собой патологии, вызываемые миофибробластами, и включают рак, фиброз и сердечно-сосудистое заболевание (рассмотрено, например, в документе Lampi и Reinhart-King (2018) “Targeting extracellular matrix stiffness to attenuate disease: From molecular mechanisms to clinical trials” *Sci Transl Med* 10(422): eaao0475). Прогрессирование фиброзных состояний связано с повышением уровня компонентов матрикса, депонированных в ECM, и/или с поддержанием/ремоделированием

ECM. TGFβ1, по меньшей мере частично, способствует этому процессу. Это подтверждается, например, тем наблюдением, что увеличение депонирования компонентов ECM, таких как коллагены, может изменять механофизические свойства ECM (например, жесткость матрикса/субстрата), и это явление связано с TGFβ1-сигнализацией. Ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, можно применять для блокирования этого процесса для противодействия прогрессированию заболевания, связанного с изменениями в ECM, такого как фиброз, рост, инвазия, метастазирование опухоли и десмоплазия. LTBP-вариант таких ингибиторов может непосредственно блокировать ECM-ассоциированные комплексы proTGFβ/латентный TGFβ, которые презентируются LTBP1 и/или LTBP3, тем самым предотвращая активацию/высвобождение фактора роста из комплекса в нише заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, могут нормализовывать жесткость ECM для лечения заболевания, которое связано с интегрин-зависимой сигнализацией. Согласно некоторым вариантам осуществления интегрин содержит цепь α11, цепь β1 или обе цепи.

[324] Таким образом, антитело можно вводить субъекту, у которого диагностировано заболевание с дисрегуляцией внеклеточного матрикса, в количестве, эффективном для лечения заболевания. Терапевтически эффективное количество антитела может представлять собой количество, достаточное для снижения экспрессии одного или нескольких маркеров миофибробластов, таких как α-SMA. Количество может представлять собой количество, достаточное для снижения жесткости внеклеточного матрикса пораженной ткани (например, фиброзных тканей). Количество может представлять собой количество, достаточное для уменьшения эффекторов TGFβ1 ниже по каскаду, таких как фосфорилирование SMAD2 и/или SMAD3. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

Заболевание, связанное с эндотелиально-мезенхимальным переходом (EndMT)

[325] Аналогично, TGFβ также является ключевым регулятором эндотелиально-мезенхимального перехода (EndMT), наблюдаемого при нормальном развитии, таком как формирование сердца. Однако такое же или подобное явление также наблюдается при многих заболеваниях, таких как раковая строма. При некоторых патологических процессах эндотелиальные маркеры, такие как CD31, регулируются понижающе при воздействии TGFβ1 и вместо этого индуцируется экспрессия мезенхимальных маркеров, таких как FSP-1, α-SMA и фибронектин. Действительно, стромальные CAF могут происходить из

эндотелиальных клеток сосудов. Таким образом, изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболевания, которое инициируется или вызывается EndMT. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

Заболевание, связанное с эпителиально-мезенхимальным переходом (EMT)

[326] EMT (эпителиально-мезенхимальный переход) представляет собой процесс, при котором эпителиальные клетки с плотными контактами переключаются на мезенхимальные свойства (фенотипы), такие как неплотные межклеточные контакты. Этот процесс наблюдается при ряде нормальных биологических процессов, а также патологических ситуаций, включая эмбриогенез, заживление ран, метастазирование рака и фиброз (рассмотрено, например, в документе Shiga *et al.*, (2015) "Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth." *Cancers*, 7: 2443-2458). Обычно считается, что сигналы EMT индуцируются главным образом TGFβ. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[327] Предполагается также, что эпителиальные клетки дают начало миофибробластам, подвергаясь процессу EMT в некоторых фиброзных тканях, таких как почки, легкое и печень. EMT происходит, когда эпителиальные клетки теряют свою кубовидную форму, теряют экспрессию белков адгезии и плотных контактов, что приводит к ослаблению межклеточных контактов и реорганизации их актинового цитоскелета; когда клетки приобретают экспрессию мезенхимальных белков (фибронектин, виментин, N-кадгерин), они принимают фибробластоподобную архитектуру, способствующую миграции и инвазии клеток. EMT индуцируется многими факторами роста, среди которых TGFβ является очень мощным индуктором, который регулирует экспрессию и активность нескольких факторов транскрипции, известных как EMT-TF (Snail1/Snail, Snail2/Slug, ZEB1, ZEB2, Twist1/Twist и другие), которые отвечают за изменение дифференцировки клеток, то есть EMT. Генными и белковыми маркерами, используемыми для идентификации образования мезенхимальных клеток после EMT в контексте фиброза, являются FSP1 (фибробласт-специфичный белок 1), α-SMA и коллаген I вместе с виментином и десмином, экспрессия которых увеличивается одновременно со снижением уровни экспрессии эпителиальных маркеров (E-кадгерина и некоторых цитокератинов). Клетки, коэкспрессирующие эпителиальные и мезенхимальные маркеры, представляют

промежуточную стадию EMT (рассмотрено, например, в документе Caja *et al., Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19(5), 1294).

[328] Многие типы рака, например, оказываются связаны с трансдифференцировкой клеток в мезенхимальный фенотип (например, CAF), что коррелирует с худшим прогнозом. Таким образом, изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболевания, которое инициируется или вызывается EMT. Действительно, приведенные в настоящем документе данные (например, фиг. 12 и 13), показывают, что такие ингибиторы обладают способностью подавлять *in vivo* экспрессию маркеров CAF, таких как α-SMA, Col1 (коллаген типа I) и FN (фибронектин). Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

Заболевание, связанное с протеазами

[329] Активация TGFβ из его латентного комплекса может быть инициирована интегрином зависимым от силы образом и/или протеазами. Данные свидетельствуют о том, что в этот процесс могут быть вовлечены определенные классы протеаз, включая, но без ограничения, протеазы Ser/Thr, такие как калликреины, хемотрипсин, эластазы, плазмин, тромбин, а также цинковые металлопротеазы семейства ADAM, такие как ADAM 10 и ADAM 17, а также семейства MMP, такие как MMP-2, MMP-9 и MMP-13. MMP-2 разрушает наиболее распространенный компонент базальной мембраны, коллаген IV, что повышает вероятность того, что она может играть роль в ECM-ассоциированной регуляции TGFβ1. Предполагается, что MMP-9 играет центральную роль в прогрессировании опухоли, ангиогенезе, ремоделировании стромы и метастазировании. Таким образом, протеаза-зависимая активация TGFβ1 в ECM может быть важна для лечения рака.

[330] Калликреины (KLK) представляют собой трипсин- или химотрипсиноподобные сериновые протеазы, к ним относятся плазменные калликреины и тканевые калликреины. ECM играет роль в тканевом гомеостазе, выступая в качестве структурного и сигнального каркаса и барьера для подавления злокачественного роста. KLK могут играть роль в деградации белков и других компонентов ECM, что может облегчать распространение и инвазию опухоли. Например, KLK1 подвергается сильной повышающей регуляции при некоторых раках молочной железы и может активировать про-MMP-2 и про-MMP-9. KLK2 активирует латентный TGFβ1, делая возможным рост рака предстательной железы рядом с фибробластами. KLK3 широко изучался как диагностический маркер рака предстательной железы (PSA). KLK3 может напрямую

активировать TGFβ1 путем превращения плазминогена в плазмин, который протеолитически отщепляет LAP. KLK6 может быть потенциальным маркером болезни Альцгеймера.

[331] Все известные активаторы TGFβ1, такие как плазмин, TSP-1 и интегрин αVβ6, непосредственно взаимодействуют с LAP. Предполагается, что протеолитическое отщепление LAP может дестабилизировать взаимодействие LAP-TGFβ, тем самым высвобождая активный TGFβ1. Предполагается, что участок, содержащий 54-LSKLRL-59 (SEQ ID NO: 301), важен для сохранения латентности TGFβ1. Таким образом, средства (например, антитела), которые стабилизируют взаимодействие или блокируют протеолитическое отщепление LAP, могут препятствовать активации TGFβ.

[332] Многие из этих протеаз, связанных с патологическими состояниями (например, раком) функционируют посредством различных механизмов действия. Таким образом, целенаправленное ингибирование определенных протеаз или комбинаций протеаз может обеспечивать терапевтическую пользу для лечения состояний, связанных с осью протеаза-TGFβ. Соответственно предполагается, что ингибиторы (например, антитела к TGFβ1), которые селективно ингибируют индуцированную протеазой активацию TGFβ1, могут быть полезны при лечении таких заболеваний (например, фиброза и рака). Аналогично, селективное ингибирование активации TGFβ1 одной протеазой по сравнению с другой протеазой также может быть предпочтительным в зависимости от подвергаемого лечению состояния. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[333] Плазмин представляет собой сериновую протеазу, продуцируемую в форме предшественника под названием плазминоген. После высвобождения плазмин попадает в кровоток и поэтому обнаруживается в сыворотке. Повышенные уровни плазмина, по-видимому, коррелируют с прогрессированием рака, возможно, посредством механизмов, включающих разрушение внеклеточного матрикса (например, базальной мембраны и стромальных барьеров), что способствует подвижности, инвазии и метастазированию опухолевых клеток. Плазмин также может влиять на адгезию, пролиферацию, апоптоз, питание рака, снабжение кислородом, образование кровеносных сосудов и активацию VEGF (Didiasova *et al.*, *Int. J. Mol. Sci*, 2014, 15, 21229-21252). Кроме того, плазмин может способствовать миграции макрофагов в опухолевое микроокружение (Philips *et al.*, *Cancer Res.* 2011 Nov 1;71(21):6676-83 и Choong *et al.*, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2003, *415S*, S46-S58). Действительно, опухолеассоциированные макрофаги (TAM) являются хорошо

охарактеризованными драйверами онкогенеза благодаря их способности стимулировать опухолевый рост, инвазию, метастазирование и ангиогенез.

[334] Активность плазмина в первую очередь связана с повреждением ECM. Тем не менее, появляется все больше доказательств того, что плазмин также регулирует последующую активацию MMP и TGF-бета. В частности, предполагается, что плазмин вызывает активацию TGF-бета посредством протеолитического отщепления ассоциированного с латентностью пептида (LAP), который происходит из N-концевого участка продукта гена TGF-бета (Horiguchi *et al.*, *J Biochem*. 2012 Oct; 152(4):321-9), что приводит к высвобождению активного фактора роста. Поскольку TGFβ1 может способствовать прогрессированию рака, это повышает вероятность того, что индуцированная плазмином активация TGFb может по меньшей мере частично опосредовать этот процесс. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[335] Также было показано, что TGFβ1 регулирует экспрессию uPA, который играет важную роль в превращении плазминогена в плазмин (Santibanez, Juan F., *ISRN Dermatology*, 2013: 597927). Независимо было показано, что uPA способствует прогрессированию рака (например, адгезии, пролиферации и миграции) путем связывания со своим рецептором клеточной поверхности (uPAR) и стимулирования превращения плазминогена в плазмин. Более того, исследования показали, что экспрессия uPA и/или ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) является предиктором плохого прогноза при колоректальном раке (D. Q. Seetoo, *et al.*, *Journal of Surgical Oncology*, vol. 82, no. 3, pp. 184–193, 2003), раке молочной железы (N. Harbeck *et al.*, *Clinical Breast Cancer*, vol. 5, no. 5, pp. 348–352, 2004) и раке кожи (Santibanez, Juan F., *ISRN Dermatology*, 2013: 597927). Таким образом, без ограничения конкретной теорией взаимодействие между плазмином, TGFβ1 и uPA может создавать петлю положительной обратной связи, способствующую прогрессированию рака. Соответственно, ингибиторы, которые селективно ингибируют плазмин-зависимую активацию TGFβ1, могут быть особенно подходящими для лечения рака, зависящего от сигнальной оси плазмин/TGFβ1.

[336] В активации GARP-ассоциированного TGFβ1 может участвовать тромбин. Сообщается, что тромбоциты экспрессируют GARP-proTGFβ1. Следовательно, тромбин может опосредовать активацию TGFβ1, воздействуя на эту ось независимым от интегрина образом.

[337] Согласно одному аспекту настоящего изобретения изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1, описанные в настоящем документе, включают ингибиторы, которые могут ингибировать протеаза-зависимую активацию TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы могут ингибировать протеаза-зависимую активацию TGFβ1 интегрин-независимым образом. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы могут ингибировать активацию TGFβ1 независимо от способа активации, например ингибировать как интегрин-зависимую активацию, так и протеаза-зависимую активацию TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления протеазу выбирают из группы, состоящей из сериновых протеаз, таких как калликреины, хемотрипсин, трипсин, эластазы, плазмин, тромбин, а также цинковых металлопротеаз (семейство MMP), таких как MMP-2, MMP-9 и MMP-13.

[338] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы могут ингибировать индуцированную плазмином активацию TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы могут ингибировать индуцированную плазмином и интегрином активацию TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы представляют собой моноклональные антитела, которые специфически связывают TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывает proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает латентный proTGFβ1, тем самым ингибируя высвобождение зрелого фактора роста из латентного комплекса. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор активации TGFβ1, подходящий для применения в способе ингибирования плазмин-зависимой активации TGFβ1, представляет собой любой из изоформно-специфичных ингибиторов, раскрытых в настоящем документе. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[339] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор (например, антитело к TGFβ1) ингибирует миграцию раковых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор ингибирует миграцию моноцитов/макрофагов. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор ингибирует накопление TAM.

[340] Согласно другому аспекту в настоящем документе предлагается способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, причем данный способ предусматривает введение субъекту эффективного количества ингибитора TGFβ1 (например, антитела к TGFβ1), причем ингибитор ингибирует индуцированную протеазой (например, плазмином) активацию TGFβ1, тем самым подвергая лечению рак у субъекта.

[341] Согласно другому аспекту в настоящем документе предлагается способ уменьшения роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта, причем данный способ предусматривает введение субъекту эффективного количества ингибитора TGFβ1 (например, антитела к TGFβ1), причем ингибитор ингибирует индуцированную протеазой (например, плазмином) активацию TGFβ1, тем самым уменьшая рост опухоли у субъекта.

Заболевание, связанное с аберрантной экспрессией генов

[342] Было замечено, что аномальная активация пути передачи сигнала TGFβ1 при различных болезненных состояниях связана с изменением экспрессии генов ряда маркеров. Эти маркеры экспрессии генов (например, измеренные с помощью иРНК) включают, но без ограничения, Serpine1 (кодирующий PAI-1), MCP-1 (также известный как CCL2), Col1a1, Col3a1, FN1, TGFβ1, CTGF, ACTA2 (кодирующий α-SMA), SNAI1 (управляет EMT при фиброзе и метастазировании путем понижающей регуляции E-кадгерина (Cdh1)), MMP2 (матриксная металлопротеаза, связанная с EMT), MMP9 (матриксная металлопротеаза, связанная с EMT), TIMP1 (матриксная металлопротеаза, связанная с EMT), FOXP3 (маркер индукции Treg), CDH1 (E-кадгерин (маркер эпителиальных клеток), который понижающе регулируется TGFβ) и CDH2 (N-кадгерин (маркер мезенхимальных клеток), который повышающе регулируется TGFβ). Что интересно, многие из этих генов играют роль в ряде разнообразных болезненных состояний, включая различные типы фиброза органов, а также во многих раках, которые включают миелофиброз. Действительно, предлагается, что есть патофизологическая связь между фиброзными состояниями и аномальной пролиферацией клеток, опухолеобразованием и метастазированием. Смотри, например, документы Cox and Erler (2014) Clinical Cancer Research 20(14): 3637-43 “Molecular pathways: connecting fibrosis and solid 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”, содержимое которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Без ограничения конкретной теорией авторы настоящего изобретения предполагают, что сигнальный путь TGFβ1 может фактически быть ключевым звеном между этими широкими патологиями.

[343] Способность хемотаксических цитокинов (или хемокинов) опосредовать рекрутирование лейкоцитов (например, моноцитов/макрофагов) в поврежденные или пораженные ткани имеет решающее значение для прогрессирования заболевания. В этот процесс вовлечены члены семейства хемокинов C-C, такие как хемоаттрактантный белок моноцитов 1 (MCP-1), также известный как CCL2, воспалительный белок макрофагов 1-альфа (MIP-1α), также известный как CCL3, и MIP-1β, также известный как CCL4.

[344] Например, считается, что MCP-1/CCL2 играет роль как при фиброзе, так и при раке. MCP-1/CCL2 характеризуется как профибротический хемокин и является хемоаттрактантом моноцитов, и данные свидетельствуют о том, что он может быть вовлечен как в инициацию, так и в прогрессирование рака. Было показано, что при фиброзе MCP-1/CCL2 играет важную роль в воспалительной фазе фиброза. Например, нейтрализация MCP-1 приводит к резкому уменьшению образования полулуний клубочков и депонирования коллагена типа I. Точно так же показано, что пассивная иммунотерапия антителами против MCP-1 или против MIP-1-альфа значительно снижает накопление мононуклеарных фагоцитов у мышей, которым вводили блеомицин, что позволяет предположить, что MIP-1-альфа и MCP-1 способствуют рекрутированию лейкоцитов во время воспалительного ответа в легких (Smith, *Biol Signals*. 1996 Jul-Aug;5(4):223-31, "Chemotactic cytokines mediate leukocyte recruitment in fibrotic lung disease"). Сообщалось о повышении уровней MIP-1-альфа у пациентов с кистозным фиброзом и множественной миеломой (смотри, например, Mrugacz *et al.*, *J Interferon Cytokine Res.* 2007 Jun;27(6):491-5), что подтверждает мнение о том, что MIP-1α связан с локализованными или системными воспалительными ответами.

[345] Ряд доказательств указывает на участие C-C-хемокинов в прогрессировании опухоли. Например, происходящий из опухоли MCP-1/CCL2 может стимулировать «прораковые» фенотипы в макрофагах. Например, было показано, что при раке легкого MCP-1/CCL2 продуцируется стромальными клетками и способствует метастазированию. При раке поджелудочной железы человека опухоли секретируют CCL2, и иммуносупрессивные CCR2-положительные макрофаги инфильтрируют эти опухоли. Пациенты с опухолями, которые демонстрируют высокую экспрессию CCL2/низкий инфильтрат CD8 Т-клеток, характеризуются значительно сниженной выживаемостью. Предполагается, что моноциты, рекрутированные в окружение поврежденной или пораженной ткани, могут впоследствии становиться поляризованными в ответ на локальные сигналы (например, в ответ на цитокины опухолевого происхождения), тем самым дополнительно способствуя прогрессированию заболевания. Эти M2-подобные макрофаги, вероятно, способствуют иммунному ускользанию, подавляя эффекторные клетки, такие как CD4+ и CD8+ Т-клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления этот процесс частично опосредуется LRRC33-TGFβ1, экспрессируемым активированными макрофагами. Согласно некоторым вариантам осуществления этот процесс частично опосредуется GARP-TGFβ1, экспрессируемым Treg.

[346] Аналогично, участие PAI-1/Serpine1 связано с различными видами рака, ангиогенезом, воспалением, нейродегенеративными заболеваниями (например, болезнью

Альцгеймера). Повышение экспрессии PAI-1 в опухоли и/или сыворотке коррелирует с плохим прогнозом (например, снижением выживания, повышением метастазирования) при различных раках, таких как рак молочной железы и рак мочевого пузыря (например, переходно-клеточная карцинома), а также миелофиброз. В контексте фиброзных состояний PAI-1 был признан важным нижележащим эффектором TGFβ1-индуцированного фиброза, и повышение экспрессии PAI-1 наблюдали при различных формах фиброза тканей, включая фиброз легких (например, идиопатический легочный фиброз (IPF)), фиброз почек, фиброз печени и склеродермию. Согласно некоторым вариантам осуществления этот процесс частично опосредуется ECM-ассоциированным TGFβ1, например через LTBP1 и/или LTBP3.

[347] Согласно некоторым вариантам осуществления эффекты терапии ингибитором TGFβ1 *in vivo* можно оценивать путем измерения изменений в генных маркерах. Подходящие маркеры включают TGFβ (например, TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3). Подходящие маркеры могут также включать одну или несколько презентирующих TGFβ (например, TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3) молекул, таких как LTBP1, LTBP3, GARP (или LRRC32) и LRRC33. Согласно некоторым вариантам осуществления подходящие маркеры включают гены мезенхимального перехода (например, фибронектин, виментин, N-кадгерин, AXL, ROR2, WNT5A, LOXL2, TWIST2, TAGLN и/или FAP), иммуносупрессивные гены (например, IL10, VEGFA, VEGFC), гены хемотаксиса моноцитов и макрофагов (например, CCL2, CCL3, CCL4, CCL7, CCL8 и CCL13) и/или различные фиброзные маркеры, рассмотренные в настоящем документе. Предпочтительными маркерами являются маркеры плазмы.

[348] Как показано в приведенных в настоящем документе примерах, изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1, описанные в настоящем документе, могут снижать уровни экспрессии многих из этих маркеров в механистической модели на животном, такой как UUO, которая, как показано, является TGFβ1-зависимой. Поэтому такие ингибиторы можно применять для лечения заболевания или нарушения, характеризующегося аномальной экспрессией (например, сверхэкспрессией/повышающей регуляцией или недостаточной экспрессией/понижающей регуляцией) одного или нескольких маркеров экспрессии генов.

[349] Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления изоформно-специфичный ингибитор TGFβ1 применяют в лечении заболевания, связанного со сверхэкспрессией одного или нескольких из следующих: PAI-1 (кодируемый Serpine1), MMP2, MMP9, MCP-1 (также известный как CCL2), Col1a1, Col3a1, FN1, TGFβ1, CTGF, α-SMA, ITGA11 и ACTA2, причем лечение содержит введение ингибитора субъекту,

страдающему от заболевания, в количестве, эффективном для лечения заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор применяют для лечения заболевания, связанного со сверхэкспрессией PAI-1, MCP-1/CCL2, CTGF и/или α-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, почек, легких, мышц, кожи и/или сердечной или сердечно-сосудистой ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание представляет собой синдром Альпорта. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор снижает экспрессию одного или нескольких из следующих: PAI-1 (кодируемый Serpine1), MMP2, MMP9, MCP-1 (также известный как CCL2), Col1a1, Col3a1, FN1, TGFβ1, CTGF, α-SMA, ITGA11 и ACTA2. Согласно предпочтительным вариантам осуществления TGFβ1-селективный ингибитор представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[350] Другим биомаркером, который можно использовать для оценки эффектов терапии ингибиторами TGFβ1 *in vivo*, является азот мочевины в крови (BUN). Мочевина естественным образом образуется в организме как побочный продукт распада белка. Мочевина перемещается из печени в почки, где она фильтруется/удаляется из крови. Соответственно, уровни BUN могут повышаться в ситуациях, когда почки пациента не функционируют должным образом. Например, у пациентов с фиброзом почек может наблюдаться повышенный BUN. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления BUN измеряют для оценки *in vivo* эффектов изоформно-специфичных ингибиторов TGFβ1, описанных в настоящем документе. Согласно другим вариантам осуществления изоформно-специфичный ингибитор TGFβ1 применяют в лечении заболевания, связанного с повышением BUN (например, фиброза почек и/или острого или хронического заболевания, повреждения или недостаточности почек). Согласно конкретному варианту осуществления заболевание, связанное с повышением BUN представляет собой синдром Альпорта.

[351] Соответственно, настоящее изобретение относится к способу отбора возможных пациента или популяции пациентов, которые, вероятно, ответят на терапию ингибированием TGFβ1. Такой способ может предусматривать стадию тестирования биологического образца, взятого у пациента (или популяции пациентов), такого как образцы биопсий, на экспрессию одного или нескольких маркеров, рассмотренных в настоящем документе. Аналогично, такой генетический маркер(ы) можно применять для

целей мониторинга реагирования пациента на терапию. Мониторинг может включать тестирование двух или более биологических образцов, взятых у пациента, например до и после введения терапии и во время применения терапевтической схемы с течением времени, для оценки изменений уровней экспрессии генов одного или нескольких маркеров, указывающих на терапевтический ответ или эффективность.

[352] Согласно некоторым вариантам осуществления способ отбора возможных пациента или популяции пациентов, которые, вероятно, ответят на терапию ингибированием TGFβ1, может предусматривать стадию идентификации пациента или популяции пациентов, ранее протестированных на генетический маркер(ы), такой как описанные в настоящем документе, у которых наблюдается его аберрантная экспрессия. Согласно некоторым вариантам осуществления аберрантная экспрессия маркера включает повышение уровней по меньшей мере одного из следующих: TGFβ1, LRRC33, GARP, LTBP1, LTBP3, CCL2, CCL3, PAI-1/Serpine1, MMP2, MMP9, Col1a1, Col3a1, FN1, CTGF, α-SMA, ITGA11 и ACTA2. Согласно некоторым вариантам осуществления пациент или популяция пациентов (например, те, у которых были взяты биологические образцы), демонстрируют повышение активации TGFβ1, фосфо-SMAD2/3 или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления пациент или популяция пациентов демонстрируют повышение BUN.

Циркулирующие/циркуляторные MDSC как биомаркер

[353] MDSC представляют собой гетерогенную популяцию клеток, названных в честь их миелоидного происхождения и их основной иммуносупрессивной функции (Gabrilovich. *Cancer Immunol Res*. 2017 Jan; 5(1): 3–8). MDSC обычно проявляют высокую пластичность и сильную способность снижать цитотоксические функции Т-клеток и клеток-естественных киллеров (NK), включая их способность стимулировать размножение Т-регуляторных клеток (Treg) и, в свою очередь, подавлять функцию Т-эффекторных клеток (Gabrilovich *et al.*, *Nat Rev Immunol.* (2012) 12:253–68). MDSC обычно подразделяют на две подгруппы, моноцитарные (m-MDSC) и гранулоцитарные (G-MDSC или PMN-MDSC), на основании экспрессии ими поверхностных маркеров (Consonni *et al.*, *Front Immunol.* 2019 May 3; 10:949). Супрессивные G-MDSC можно охарактеризовать по продуцированию ими активных форм кислорода (ROS) как основного механизма подавления иммунитета. Напротив, M-MDSC опосредуют иммунную супрессию в основном путем повышающей регуляции гена индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и продуцируют оксид азота (NO), а также ряд иммуносупрессивных цитокинов (Youn and Garilovich, *Eur J Immunol.* 2010 Nov; 40(11): 2969–2975).

[354] Согласно некоторым вариантам осуществления пациент или популяция пациентов (например, у которых были взяты биологические образцы) демонстрируют повышение уровня MDSC. Согласно некоторым вариантам осуществления образец представляет собой образец цельной крови или компонент крови (например, плазму или сыворотку). Согласно некоторым вариантам осуществления образец представляет собой свежие цельную кровь или компонент крови (например, из образца, который ранее не был заморожен).

[355] Согласно некоторым вариантам осуществления у пациента или популяции пациентов есть фиброзное нарушение или заболевание (такое как фиброз органов). Согласно некоторым вариантам осуществления у пациента есть NASH.

[356] Согласно конкретным вариантам осуществления ингибитор TGFβ, описанный в настоящем документе, например изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1, такой как Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные, изоформно-неселективный ингибитор, например низкомолекулярные антагонисты ALK5, нейтрализующие антитела, которые связывают два или более из TGFβ1/2/3, например GC1008 и варианты, антитела, которые связывают TGFβ1/3, ловушки лигандов, например ингибиторы TGFβ1/3, и/или ингибитор интегрина (например, антитело, которое связывается с интегринами αVβ3, αVβ5, αVβ6, αVβ8, α5β1, αIIbβ3 или α8β1 и ингибирует последующую активацию TGFβ, например селективно ингибирует TGFβ1 и/или TGFβ3), вводят так, чтобы количество (например, доза) введенного ингибитора TGFβ1 было достаточным для снижения уровней циркулирующих MDSC по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25% или более по сравнению с исходными уровнями MDSC. Уровни циркулирующих MDSC можно измерять до или после каждого лечения или каждой дозы ингибитора TGFβ, так что снижение уровней циркулирующих MDSC по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25% или более может указывать или предсказывать эффективность лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления уровень циркулирующих MDSC можно применять для определения нагрузки заболевания (например, измеренной по изменению фиброза до и после применения схемы лечения). Согласно конкретным вариантам осуществления снижение уровней циркулирующих MDSC может указывать на снижение нагрузки заболевания (например, уменьшение фиброза). Например, уровни циркулирующих MDSC можно измерять до и после введения дозы ингибитора TGFβ, описанного в настоящем документе, например изоформно-селективного ингибитора активации TGFβ1, такого как Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные, изоформно-неселективных ингибиторов TGFβ, например низкомолекулярных антагонистов ALK5, нейтрализующих антител, которые

связывают два или более из TGFβ1/2/3, например GC1008 и вариантов, антител, которые связывают TGFβ1/3, ловушек лигандов, например ингибиторов TGFβ1/3, и/или ингибитора интегрина (например, антитела, которое связывается с интегринами αVβ3, αVβ5, αVβ6, αVβ8, α5β1, αIIbβ3 или α8β1 и ингибирует последующую активацию TGFβ, например, селективно ингибирует TGFβ1 и/или TGFβ3), и снижение уровней циркулирующих MDSC может указывать или предсказывать фармакологические эффекты, например снижение нагрузки заболевания (например, уменьшение фиброза). Согласно конкретным вариантам осуществления уровни циркулирующих MDSC можно измерять до и после введения первой дозы ингибитора TGFβ, такого как ингибитор TGFβ, описанный в настоящем документе, например изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1, такой как Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные, изоформно-неселективный ингибитор, например низкомолекулярные антагонисты ALK5, нейтрализующие антитела, которые связывают два или более из TGFβ1/2/3, например GC1008 и варианты, антитела, которые связывают TGFβ1/3, ловушки лигандов, например ингибиторы TGFβ1/3, и/или ингибитор интегрина (например, антитело, которое связывается с интегринами αVβ3, αVβ5, αVβ6, αVβ8, α5β1, αIIbβ3 или α8β1 и ингибирует последующую активацию TGFβ, например селективно ингибирует TGFβ1 и/или TGFβ3). Согласно некоторым вариантам осуществления снижение уровней циркулирующих MDSC указывает или предсказывает фармакологические эффекты и служит дополнительным основанием для введения второй или следующей дозы (доз) ингибитора TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления первая доза ингибитора TGFβ представляет собой самую первую дозу ингибитора TGFβ, полученную пациентом. Согласно некоторым вариантам осуществления первая доза ингибитора TGFβ является первой дозы данной схемы лечения, содержащей более одной дозы ингибитора TGFβ. Согласно другому варианту осуществления уровни циркулирующих MDSC можно измерять до и после комбинированного лечения, содержащего ингибитор TGFβ, описанный в настоящем документе, например изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1, такой как Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные. Согласно некоторым вариантам осуществления снижение уровней циркулирующих MDSC после лечения ингибитором TGFβ, описанным в настоящем документе, например изоформно-селективным ингибитором активации TGFβ1, таким как Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные, изоформно-неселективным ингибитором, например низкомолекулярными антагонистами ALK5, нейтрализующими антителами, которые связывают два или более из TGFβ1/2/3, например GC1008 и вариантами, антителами, которые связывают TGFβ1/3, ловушками лигандов, например ингибиторами TGFβ1/3, и/или ингибитором интегрина (например, антителом, которое связывается с

интегринами αVβ3, αVβ5, αVβ6, αVβ8, α5β1, αIIbβ3 или α8β1 и ингибирует последующую активацию TGFβ, например, селективно ингибирует TGFβ1 и/или TGFβ3), может обуславливать продолжение лечения.

[357] Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к способу лечения фиброза у субъекта, причем данный способ предусматривает стадии выбора ингибитора TGFβ, который ингибирует TGFβ1, но не ингибирует один или оба из TGFβ2 и TGFβ3; введения субъекту с фиброзным состоянием данного ингибитора TGFβ в количестве, достаточном для снижения уровней циркулирующих MDSC. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни циркулирующих MDSC определяют в цельной крови или компоненте крови, взятых у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни циркулирующих MDSC снижаются по меньшей мере на 10%, необязательно по меньшей мере на 15%, 20%, 25% или более.

[358] Согласно некоторым вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор TGFβ1, описанный в настоящем документе, применяют в способе снижения уровней циркулирующих MDSC у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни циркулирующих MDSC определяют в цельной крови или компоненте крови, взятых у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни циркулирующих MDSC снижаются по меньшей мере на 10%, необязательно по меньшей мере на 15%, 20%, 25% или более. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ вводят в количестве, достаточном для снижения уровней циркулирующих MDSC.

[359] Согласно конкретным вариантам осуществления настоящего изобретения уровни циркулирующих MDSC можно использовать для прогнозирования, определения и мониторинга фармакологических эффектов лечения, включающего дозу ингибитора TGFβ, такого как ингибитор TGFβ, описанный в настоящем документе, например изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1, такой как Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные, изоформно-неселективный ингибитор, например низкомолекулярные антагонисты ALK5, нейтрализующие антитела, которые связывают два или более из TGFβ1/2/3, например GC1008 и варианты, антитела, которые связывают TGFβ1/3, ловушки лигандов, например ингибиторы TGFβ1/3, и/или ингибитор интегрина (например, антитело, которое связывается с интегринами αVβ3, αVβ5, αVβ6, αVβ8, α5β1, αIIbβ3 или α8β1 и ингибирует последующую активацию TGFβ, например селективно ингибирует TGFβ1 и/или TGFβ3), введенный отдельно или в сочетании с другим терапевтическим средством. Согласно конкретным вариантам осуществления циркулирующие MDSC можно измерять в течение шести недель после введения начального лечения (например, (первой) дозы

ингибитора TGFβ). Согласно конкретным вариантам осуществления уровни циркулирующих MDSC можно измерять в течение тридцати дней после введения начальной дозы ингибитора TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни MDSC можно измерять в течение или через приблизительно три недели после введения начальной дозы ингибитора TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни MDSC можно измерять в течение или через приблизительно две недели после введения начальной дозы ингибитора TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни MDSC можно измерять в течение или через приблизительно десять дней после введения начальной дозы ингибитора TGFβ.

[360] Согласно некоторым вариантам осуществления у такого пациента или популяции пациентов рак, который может содержать солидную опухоль. Солидная опухоль может представлять собой TGFβ1-доминантную опухоль, в которой TGFβ1 является преобладающей изоформой, экспрессируемой в опухоли, по сравнению с другими изоформами. Согласно некоторым вариантам осуществления такие пациент или популяция пациентов проявляют резистентность к терапия рака, такой как химиотерапия, лучевая терапия и/или терапия с помощью иммунных контрольных точек, например анти-PD-1 (например, пембролизумаб и ниволумаб), анти-PD-L1 (например, атезолизумаб), анти-CTLA4 (например, ипилимумаб), терапия сконструированными иммунными клетками (например, CAR-T) и вакцины против рака и так далее. В соответствии с настоящим изобретением изоформно-специфичный ингибитор TGFβ1, такой как раскрытые в настоящем документе, преодолевает резистентность путем разблокирования иммуносупрессии, чтобы позволить эффекторным клеткам получить доступ к раковым клеткам, тем самым достигая противоопухолевых эффектов.

*Пролиферативные нарушения (*например, *миелопролиферативное нарушение)*

[361] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения пролиферативного нарушения. Согласно некоторым вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор TGFβ1, описанный в настоящем документе, предназначен для применения в лечении миелопролиферативного нарушения у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления пролиферативное нарушение представляет собой рак или миелопролиферативное нарушение. Согласно некоторым вариантам осуществления миелопролиферативное нарушение представляет собой миелофиброз.

[362] Миелофиброз, также известный как остеомиелофиброз, представляет собой относительно редкое пролиферативное нарушение (рак) костного мозга, которое принадлежит к группе заболеваний, называемых миелопролиферативными нарушениями.

Миелофиброз относят к негативной по филадельфийской хромосоме (-) ветви миелопролиферативных новообразований. Миелофиброз характеризуется клональной миелопролиферацией, аберрантной продукцией цитокинов, экстрамедуллярным гемопоэзом и фиброзом костного мозга. Пролиферация аномального клона гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге и других местах приводит к фиброзу или замещению костного мозга рубцовой тканью. Термин миелофиброз, если не указано иное, относится к первичному миелофиброзу (PMF). Он также может называться хроническим идиопатическим миелофиброзом (cIMF) (термины идиопатический и первичный означают, что в этих случаях заболевание имеет неизвестное или спонтанное происхождение). 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 (MMM) также используются для обозначения первичного миелофиброза. Согласно некоторым вариантам осуществления гематологические пролиферативные нарушения, которые можно лечить в соответствии с настоящим изобретением, включают миелопролиферативные нарушения, такие как миелофиброз. Так называемая «классическая» группа негативных по BCR-ABL (Ph) хронических миелопролиферативных нарушений включает эссенциальную тромбоцитемию (ET), истинную полицитемию (PV) и первичный миелофиброз (PMF).

[363] Миелофиброз нарушает нормальную выработку организмом клеток крови. Результатом является обширное рубцевание костного мозга, что приводит к тяжелой анемии, слабости, утомляемости и часто к увеличению селезенки. Продукция цитокинов, таких как фактор роста фибробластов, аномальным клоном гемопоэтических клеток (особенно мегакариоцитами) приводит к замещению гемопоэтической ткани костного мозга соединительной тканью посредством коллагенового фиброза. Уменьшение количества гемопоэтической ткани ухудшает способность пациента генерировать новые клетки крови, что приводит к прогрессирующей панцитопении, нехватке клеток крови всех типов. Однако считается, что пролиферация фибробластов и депонирование коллагена являются вторичным явлением, и сами фибробласты могут не быть частью аномального клеточного клона.

[364] 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.

[365] Первичный миелофиброз связан с мутациями янус-киназы 2 (JAK2), рецептора тромбопоэтина (MPL) и кальретикулина (CALR), что может приводить к конститутивной активации пути JAK-STAT, происходит прогрессирующее рубцевание или фиброз костного мозга. У пациентов может развиться экстрамедуллярный гемопоэз, то есть образование клеток крови в других местах, помимо костного мозга, поскольку гемопоэтические клетки вынуждены мигрировать в другие области, особенно в печень и селезенку. Это вызывает увеличение этих органов. В печени аномальный размер называется гепатомегалией. Увеличение селезенки называется спленомегалией, и она также способствует возникновению панцитопении, особенно тромбоцитопении и анемии. Еще одним осложнением экстрамедуллярного гемопоэза является пойкилоцитоз или наличие красных клеток крови неправильной формы.

[366] Основным местом экстрамедуллярного кроветворения при миелофиброзе является селезенка, которая обычно заметно увеличена у пациентов, страдающих миелофиброзом. В результате массивного увеличения селезенки в селезенке часто возникают множественные субкапсулярные инфаркты, а это означает, что из-за нарушения снабжения селезенки кислородом происходит частичное или полное отмирание тканей. На клеточном уровне селезенка содержит предшественники красных кровяных клеток, предшественники гранулоцитов и мегакариоциты, причем мегакариоциты выделяются своим количеством и аномальной формой. Мегакариоциты могут быть вовлечены в возникновение вторичного фиброза, наблюдаемого при этом состоянии.

[367] Предполагается, что TGFβ может быть вовлечен в фиброзный аспект патогенеза миелофиброза (смотри, например, Agarwal *et al.*, “Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGFβ” (2016) *Stem Cell Investig* 3:5). Патология костного мозга при первичном миелофиброзе характеризуется фиброзом, неоангиогенезом и остеосклерозом, и фиброз связан с увеличением продукции коллагенов, депонированных в ECM.

[368] Описан ряд биомаркеров, изменения которых свидетельствует о заболевании или коррелирует с ним. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркеры представляют собой клеточные маркеры. Такие ассоциированные с заболеванием биомаркеры применимы для диагностики и/или мониторинга прогрессирования заболевания, а также эффективности терапии (например, реагирования пациентов на терапию). Эти биомаркеры включают ряд фиброзных маркеров, а также клеточные маркеры. Например, сообщается, что при раке легкого концентрация TGFβ1 в жидкости

бронхоальвеолярного лаважа (BAL) значительно выше у пациентов с раком легкого по сравнению с пациентами с доброкачественными заболеваниями (увеличение в ~2+ раза), что также может служить биомаркером диагностики и/или мониторинга прогрессирования или эффектов лечения рака легкого.

[369] Поскольку первичный миелофиброз связан с аномальным развитием мегакариоцитов, определенные клеточные маркеры мегакариоцитов, а также их предшественников в линии стволовых клеток могут служить маркерами диагностики и/или мониторинга прогрессирования заболевания, а также эффективности терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления применимые маркеры включают, но без ограничения, клеточные маркеры дифференцированных мегакариоцитов (например, CD41, CD42 и Tpo R), клеточные маркеры мегакариоцитарно-эритроидных клеток-предшественников (например, CD34, CD38 и CD45RA-), клеточные маркеры общих предшественников миелоидных клеток (например, IL-3α/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 маркеры фиброза. К ним относятся без ограничения TGFβ1, PAI-1 (также известный как Serpine1), MCP-1 (также известный как CCL2), Col1a1, Col3a1, FN1, CTGF, α-SMA, ACTA2, Timp1, Mmp8 и Mmp9. Согласно некоторым вариантам осуществления применимые биомаркеры представляют собой сывороточные маркеры (например, белки или фрагменты, обнаруженные и детектируемые в образцах сыворотки).

[370] На основании того факта, что TGFβ является компонентом лейкозной ниши костного мозга, предполагается, что нацеливание на микроокружение костного мозга с помощью ингибиторов TGFβ может быть многообещающим подходом к уменьшению количества лейкозных клеток, экспрессирующих презентирующие молекулы, которые регулируют локальную доступность TGFβ в пораженной ткани.

[371] Действительно, из-за многогранной природы патологии, которая проявляется TGFβ-зависимой дисрегуляцией как в миелопролиферативном, так и в фиброзном аспектах (как предполагает сам термин «миелофиброз»), изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1, которые нацелены на ассоциированные с матриксом и клетками комплексы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, могут оказывать особенно благоприятные терапевтические эффекты на пациентов, страдающих миелофиброзом. Предполагается, что LTBP-вариант такого ингибитора может нацеливаться на ECM-ассоциированный комплекс TGFβ1 в костном мозге, тогда как LRRC33-вариант ингибитора может блокировать ассоциированный с миелоидными клетками TGFβ1. Кроме того, аномальная биология мегакариоцитов, связанная с миелофиброзом, может включать как GARP-, так и LTBP-

опосредованную активность TGFβ1. Изоформно-специфичный ингибитор TGFβ1 способен нацеливаться на такие комплексы, тем самым ингибируя высвобождение активного TGFβ1 в нише.

[372] Таким образом, такие ингибиторы TGFβ1 применимы для лечения пациентов с истинной полицитемией, у которых был неадекватный ответ или непереносимость других (или стандартных) методов лечения, таких как гидроксимочевина и ингибиторы JAK. Такие ингибиторы также применимы для лечения пациентов с миелофиброзом (MF) промежуточного или высокого риска, включая первичный MF, MF после истинной полицитемии и MF после эссенциальной тромбоцитемии. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[373] Соответственно, один аспект настоящего изобретения относится к способам лечения первичного миелофиброза. Способ предусматривает введение пациенту, страдающему первичным миелофиброзом, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей ингибитор TGFβ, который вызывает снижение доступности TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления пациентам с миелофиброзом вводят ингибитор активации TGFβ1. Такое антитело можно вводить в дозах в диапазоне от 0,1 до 100 мг/кг, таких как 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 так далее. Например, подходящие схемы применения включают введение от 1 до 20 мг/кг еженедельно. Предпочтительными путями введения фармацевтической композиции, содержащей антитело, являются внутривенное или подкожное введение. Когда композицию вводят внутривенно, пациенту можно вводить терапевтическое средство в течение подходящего периода времени, например приблизительно 30-120 минут (например, 30 мин., 60 мин., 75 мин., 90 мин. и 120 мин.) на курс лечения, а затем повторять каждые несколько недель, например 3 недели, 4 недели, 6 недель и так далее, в течение нескольких циклов, например 4 цикла, 6, циклов, 8 циклов, 10 циклов, 12 циклов и так далее. Согласно некоторым вариантам осуществления пациентов подвергают лечению композицией, содержащей ингибирующее антитело в дозе 1-10 мг/кг (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг на введение) путем внутривенного введения каждые 28 дней (4 недели) в течение 6 циклов или 12 циклов. Согласно некоторым вариантам осуществления такое лечение проводят в виде хронической (длительной) терапии (например, ее следует продолжать неопределенно долго, пока это считают полезным) вместо прекращения после определенного количества циклов введения.

[374] Хотя миелофиброз считается разновидностью лейкоза, он также характеризуется проявлением фиброза. Поскольку известно, что TGFβ регулирует аспекты гомеостаза ECM, дисрегуляция которого может приводить к фиброзу тканей, желательно ингибировать активность TGFβ, связанную с ECM. Соответственно, антитела или фрагменты, описанные в настоящем документе, ингибируют proTGFβ, презентируемый LTBP (таким как LTBP1 и LTBP3), а также ингибируют proTGFβ, презентируемый GARP и LRRC33.

[375] Прежние данные *in vivo* указывают на то, что изоформно-селективный ингибитор TGFβ1, такой как описанные в настоящем документе, можно применять для лечения миелофиброза в переносимой модели первичного миелофиброза на мышах. В отличие от ингибитора JAK2, используемого в настоящее время в качестве стандарта лечения, который обеспечивает только симптоматическое облегчение, но не обеспечивает клинического улучшения или улучшения выживаемости, изоформно-селективный ингибитор TGFβ1 обеспечивает значительный антифибротический эффект в костном мозге больных мышей, а также может продлевать выживаемость, подтверждая мнение о том, что ингибитор TGFβ1 может быть эффективным для лечения миелопролиферативных нарушений у пациентов-людей.

[376] Подходящие популяции пациентов с миелопролиферативными новообразованиями, которых можно лечить с помощью композиций и способов, описанных в настоящем документе, могут включать, но без ограничения: a) популяцию пациентов Филадельфия(+); b) популяцию пациентов Филадельфия(-); c) популяцию пациентов, которую классифицируют как «классическую» (PV, ET и PMF); d) популяцию пациентов, несущих мутацию JAK2V617F(+); e) популяцию пациентов, несущих JAK2V617F(-); f) популяцию пациентов с экзоном 12(+) JAK2; g) популяцию пациентов с MPL(+); и h) популяцию пациентов с CALR(+).

[377] Согласно некоторым вариантам осуществления популяция пациентов включает пациентов с миелофиброзом промежуточного-2 или высокого риска. Согласно некоторым вариантам осуществления популяция пациентов содержит субъектов с миелофиброзом, которые невосприимчивы к доступной терапии или не являются кандидатами на нее. Согласно некоторым вариантам осуществления количество тромбоцитов у субъекта составляет 100-200×10^9/л. Согласно некоторым вариантам осуществления количество тромбоцитов у субъекта составляет >200×10^9/л до получения лечения.

[378] Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта, который получает (и который может получать пользу от получения) терапию изоформно-специфичными

ингибиторами TGFβ1, диагностирован первичный миелофиброз (PMF) промежуточного-1 или более высокого риска или миелофиброз после истинной полицитемии/эссенциальной тромбоцитемии (post-PV/ET MF). Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта до начала лечения был зарегистрирован фиброз костного мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления до лечения у субъекта MF-2 или выше по шкале оценивания Европейского консенсуса и степень 3 или выше по модифицированный шкале Bauermeister. Согласно некоторым вариантам осуществления до лечения у субъекта общее состояние 1 по шкале ECOG. Согласно некоторым вариантам осуществления до лечения количество белых кровяных клеток у субъекта (10^9/л) находится в диапазоне от 5 до 120. Согласно некоторым вариантам осуществления аллельная нагрузка *JAK2V617F* у субъекта лежит в диапазоне 10-100%.

[379] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, который получает (и который может получать пользу от получения) терапию изоформно-специфичными ингибиторами TGFβ1, зависит от трансфузий (до лечения), что характеризуется тем, что у субъекта в истории по меньшей мере две единицы трансфузии красных кровяных клеток за последний месяц при уровне гемоглобина менее 8,5 г/дл, не связанном с клинически явным кровотечением.

[380] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, который получает (и который может получать пользу от получения) терапию изоформно-специфичными ингибиторами TGFβ1, ранее получал терапию для лечения миелофиброза. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект проходил лечение одним или несколькими видами терапии, включая, но без ограничения, AZD1480, панобиностат, EPO, IFNα, гидроксимочевину, пегилированный интерферон, талидомид, преднизон и ингибитор JAK2 (например, лестауртиниб, CEP-701).

[381] Согласно некоторым вариантам осуществления у пациента экстрамедуллярный гемопоэз. Согласно некоторым вариантам осуществления экстрамедуллярный гемопоэз происходит в печени, легких, селезенке и/или лимфатических узлах. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят местно в один или несколько локализованных участков проявления заболевания.

[382] Согласно некоторым вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор TGFβ1 предназначен для применения в лечении миелопролиферативного нарушения у субъекта. Изоформно-специфичный ингибитор TGFβ1 вводят пациентам в количестве, эффективном для лечения миелофиброза.

[383] Терапевтически эффективное количество представляет собой количество, достаточное для облегчения одного или нескольких симптомов и/или осложнений миелофиброза у пациентов, включая, но без ограничения, избыточное депонирование ECM в строме костного мозга, неоангиогенез, остеосклероз, спленомегалию, гематомегалию, анемию, кровотечение, боль в костях и другие заболевания, связанные с костями, экстрамедуллярный гемопоэз, тромбоцитоз, лейкопению, кахексию, инфекции, тромбоз и смерть. Согласно предпочтительным вариантам осуществления ингибитор представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[384] Согласно некоторым вариантам осуществления количество является эффективным для снижения экспрессии и/или секреции TGFβ1 (например, мегакариоцитарными клетками) у пациентов. Таким образом, такой ингибитор может снижать уровни иРНК TGFβ1 у получивших его пациентов. Согласно некоторым вариантам осуществления такой ингибитор снижает уровни иРНК TGFβ1 в костном мозге, например в мононуклеарных клетках. У пациентов с PMF обычно наблюдают повышенные уровни TGFβ1 в плазме выше ~2500 пг/мл, например выше 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 и 10000 пг/мл (в отличие от нормальных диапазонов ~600-2000 пг/мл при измерении с помощью ELISA) (смотри, например, Mascaremhas *et al.*, (*Leukemia & Lymphoma*, 2014, 55(2): 450-452)). Zingariello (*Blood*, 2013, 121(17): 3345-3363) количественно определил содержание биоактивного и общего TGFβ1 в плазме пациентов с PMF и контрольных индивидуумов. Согласно этой ссылке, медиана биоактивного TGFβ1 у пациентов с PMF составляет 43 нг/мл (в диапазоне 4-218 нг/мл), а общий TGFβ1 составляет 153 нг/мл (32-1000 нг/мл), в то время как в контрольной группе значения составляли 18 (0,05-144) и 52 (8-860) соответственно. Таким образом, на основании этих сообщений содержание TGFβ1 в плазме у пациентов с PMF повышено в несколько раз, например в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз и так далее, по сравнению с образцами контрольной или здоровой плазмы. Лечение описанным в настоящем документе ингибитором, например после 4-12 циклов введения (например, 2, 4, 6, 8, 10, 12 циклов) или хронического или длительного лечения, например каждые 4 недели, в дозе 0,1-100 мг/кг, например 1-30 мг/кг, моноклонального антитела, может снижать уровни TGFβ1 в плазме по меньшей мере на 10% по сравнению с соответствующим исходным уровнем (до лечения), например по меньшей мере на 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% и 50%.

[385] Некоторые из терапевтических эффектов 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, получавших ингибитор, в течение 1-8 недель. Это затрагивает гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники крови. Для оценки изменений плотности/количества клеток костного мозга может быть выполнена биопсия костного мозга. Соответственно, у пациента могут наблюдаться улучшения таких симптомов, как боль в костях и утомляемость.

[386] Одним из морфологических признаков миелофиброза является фиброз костного мозга (например, стромы костного мозга), частично характеризующийся аберрантным ECM. Согласно некоторым вариантам осуществления количество является эффективным для уменьшения избыточного депонирования коллагена, например, мезенхимальными стромальными клетками. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор эффективен для снижения количества CD41-положительных клеток, например мегакариоцитов, у получающих лечение субъектов по сравнению с контрольными субъектами, которые не получают лечение. Согласно некоторым вариантам осуществления исходная плотность мегакариоцитов в костном мозге при PMF может находиться в диапазоне 200-700 клеток ($мм^2$), а в селезенке при PMF 40-300 мегакариоцитов на квадратный миллиметр ($мм^2$), как определено при случайном выборе срезов. Напротив, плотность мегакариоцитов в костном мозге и селезенке нормальных доноров составляет менее 140 и менее 10 соответственно. Лечение ингибитором может снижать количество (например, плотность) мегакариоцитов в костном мозге и/или селезенке. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение ингибитором может вызывать снижение уровней нижележащей эффекторной сигнализации, например фосфорилирование SMAD2/3.

[387] Пациенты с миелофиброзом могут страдать от увеличения селезенки. Таким образом, клинические эффекты терапевтического средства можно оценивать, отслеживая изменения размера селезенки. Размер селезенки можно исследовать с помощью известных методов, таких как оценка длины селезенки путем пальпации и/или оценка объема селезенки с помощью ультразвука. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта, подлежащего лечению изоформно-специфичным ингибитором TGFβ1, исходная длина селезенки (до лечения) составляет 5 см или больше, например в диапазоне от 5 до 30 см при оценке с помощью пальпации. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта, подлежащего лечению изоформно-специфичным ингибитором TGFβ1, исходный объем селезенки (до лечения) составляет 300 мл или больше, например в диапазоне 300-1500 мл, при оценке с помощью ультразвука. Лечение описанным в настоящем документе ингибитором, например после 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 уменьшать

размер селезенки у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество ингибитора является достаточным для уменьшения размера селезенки в популяция пациентов, которые получают лечение ингибитором, по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 50% и 60% по сравнению с соответствующими исходными значениями. Например, лечение эффективно для достижения уменьшения объема селезенки ≥35% относительно исходного через 12-24 недели при измерении с помощью сканирования МРТ или КТ по сравнению с контролем плацебо. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение эффективно для достижения уменьшения объема селезенки ≥35% относительно исходного через 24-48 недель при измерении с помощью сканирования МРТ или КТ по сравнению с контролем в виде наилучшей доступной терапии. Наилучшая доступная терапия может включать гидроксимочевину, глюкокортикоиды, а также отсуствие приема лекарственных средств, анагрелид, эпоэтин альфа, талидомид, леналидомид, меркаптопурин, тиогуанин, даназол, пегинтерферон альфа-2а, интерферон-α, мелфалан, ацетилсалициловую кислоту, цитарабин и колхицин.

[388] Согласно некоторым вариантам осуществления популяция пациентов, получавших лечение изоформно-специфичным ингибитором TGFβ1, таким как описанные в настоящем документе, демонстрирует статистически улучшенный ответ на лечение при оценке, например, по критериям Международной рабочей группы по исследованию и лечению миелофиброза (IWG-MRT), по величине изменения степени фиброза костного мозга, измеренной по модифицированной шкале Bauermeister и системе оценивания Европейского консенсуса после лечения (например, 4, 6, 8 или 12 циклов), по симптоматическому ответу с использованием формы оценки симптомов миелопролиферативного новообразования (MPN-SAF).

[389] Согласно некоторым вариантам осуществления лечение изоформно-специфичным ингибитором TGFβ1, таким как описанные в настоящем документе, обеспечивает статистически улучшенный ответ на лечение при оценке, например, с помощью модифицированной формы оценки симптомов миелофиброза (MFSAF), причем симптомы измеряют с помощью инструмента MFSAF (такого как v2.0), ежедневного дневника, фиксирующего изнурительные симптомы миелофиброза (абдоминальный дискомфорт, чувство быстрого насыщения, боль под ребрами с левой стороны, зуд, ночная потливость и боль костях/мышцах) по шкале от 0 до 10, где 0 соответствует отсутствию, а 10 соответствует наихудшему возможному варианту. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение эффективно для достижения снижения общей оценки MFSAF на ≥50% от исходной через, например, 12-24 недель. Согласно некоторым вариантам осуществления значительная часть пациентов, получающих терапию, достигает улучшения

по шкале общей оценки симптомов ≥50% по сравнению с пациентами, получавшими плацебо. Например, часть пула пациентов, достигающих улучшения ≥50%, может составлять более 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80%.

[390] Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтически эффективное количество ингибитора представляет собой количество, достаточное для достижения клинического улучшения при оценке по ответу на анемию. Например, улучшенный ответ на анемию может включать более длительную независимость от трансфузий, например 8 недель или дольше, после лечения в течение 4-12 циклов, например 6 циклов.

[391] Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтически эффективное количество ингибитора представляет собой количество, достаточное для поддержания стабильного заболевания в течение определенного периода времени, например 6 недель, 8 недель, 12 недель, шесть месяцев и так далее. Согласно некоторым вариантам осуществления прогрессирование заболевания можно оценивать по изменениям общей насыщенности костного мозга клетками, степени ретикулинового или коллагенового фиброза и/или изменению аллельной нагрузки *JAK2V617F*.

[392] Согласно некоторым вариантам осуществления популяция пациентов, получавших лечение изоформно-специфичным ингибитором TGFβ1, таким как описанные в настоящем документе, демонстрирует статистически улучшенную выживаемость по сравнению с контрольной популяцией, которая не получала лечения. Например, в контрольных группах медианная выживаемость пациентов с PMF составляет приблизительно шесть лет (приблизительно 16 месяцев у пациентов с высоким риском), и ожидается, что менее 20% пациентов проживут 10 лет или дольше после постановки диагноза. Лечение изоформно-специфичным ингибитором TGFβ1, таким как описанные в настоящем документе, может увеличивать время выживания по меньшей мере на 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяцев, 30 месяцев, 36 месяцев или 48 месяцев. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение эффективно для достижения улучшенной общей выживаемости через 26 недель, 52 недель, 78 недель, 104 недель, 130 недель, 144 недель или 156 недель по сравнению с пациентами, получавшими плацебо.

[393] Клиническую пользу терапии, такой как приведенная выше в качестве примера, можно наблюдать у пациентов с впервые возникшей анемией или без нее.

[394] Одним из преимуществ изоформно-специфичных ингибиторов TGFβ1 является то, что они сохраняют улучшенные профили безопасности, обеспечиваемые изоформной селективностью, по сравнению с обычными антагонистами TGFβ, не обладающими селективностью. Поэтому ожидается, что лечение изоформно-специфичным ингибитором TGFβ1, таким как описанные в настоящем документе, может уменьшать

нежелательные явления в популяции пациентов по сравнению с эквивалентными популяциями пациентов, получавшими обычные антагонисты TGFβ, применительно к частоте и/или тяжести таких явлений. Таким образом, изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1 могут обеспечивать большее терапевтическое окно в отношении дозировки и/или продолжительности лечения. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[395] Нежелательные явления можно классифицировать с помощью подходящих способов, признанных в данной области техники, таких как Общие терминологические критерии нежелательных явлений (CTCAE) версии 4. Упомянутые ранее нежелательные явления у пациентов-людей, получавших антагонисты TGFβ, такие как GC1008, включают лейкоцитоз (степень 3), утомляемость (степень 3), гипоксию (степень 3), асистолию (степень 5), лейкопению (степень 1), рецидивирующие транзиторные болезненные эритематозные узелковые поражения кожи, гнойный дерматит и опоясывающий герпес.

[396] Терапия изоформно-специфичными ингибиторами TGFβ1 может вызывать у пациентов с миелофиброзом менее частые и/или менее тяжелые нежелательные явления (побочные эффекты) по сравнению с терапией ингибитором JAK в том, что касается, например, анемии, тромбоцитопении, нейтропении, гиперхолестеринемии, повышенного уровня аланинтрансаминазы (ALT), повышенного уровня аспартаттрансаминазы (AST), ушибов, головокружения и головной боли, обеспечивая, таким образом, более безопасный вариант лечения.

[397] Предполагается, что ингибиторы TGFβ1-сигнализации можно применять в сочетании с одним или несколькими терапевтическими средствами для лечения миелофиброза в виде комбинированной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор активации TGFβ1, описанный в настоящем документе, вводят пациентам, страдающим миелофиброзом, которые получали ингибитор JAK1, ингибитор JAK2 или ингибитор JAK1/JAK2. Согласно некоторым вариантам осуществления такие пациенты реагируют на терапию ингибитором JAK1, ингибитором JAK2 или ингибитором JAK1/JAK2, тогда как согласно другим вариантам осуществления такие пациенты плохо реагируют или не реагируют на терапию ингибитором JAK1, ингибитором JAK2 или ингибитором JAK1/JAK2. Согласно некоторым вариантам осуществления применение изоформно-специфичного ингибитора TGFβ1, описанного в настоящем документе, может делать более восприимчивыми тех, кто плохо реагирует или не реагирует на терапию ингибитором JAK1, ингибитором JAK2 или ингибитором JAK1/JAK2. Согласно некоторым

вариантам осуществления применение изоформно-специфичного ингибитора TGFβ1, описанного в настоящем документе, может позволять уменьшать дозу ингибитора JAK1, ингибитора JAK2 или ингибитора JAK1/JAK2, при сохранении эквивалентной клинической эффективности у пациентов, но при снижении или уменьшении степени связанных с лекарственным средством токсичности или нежелательных явлений (таких как перечисленные выше). Согласно некоторым вариантам осуществления лечение ингибитором активации TGFβ1, описанным в настоящем документе, в сочетании с терапией ингибитором JAK1, ингибитором JAK2 или ингибитором JAK1/JAK2 может производить синергетические или аддитивные терапевтические эффекты у пациентов. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение ингибитором активации TGFβ1, описанным в настоящем документе, может усиливать пользу от ингибитора JAK1, ингибитора JAK2 или ингибитора JAK1/JAK2 или другой терапии, назначаемой для лечения миелофиброза. Согласно некоторым вариантам осуществления пациенты могут дополнительно получать терапевтические средства для лечения анемии, связанной с миелофиброзом. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированная терапия содержит ингибитор контрольных точек, такой как антитело к PD-(L)1.

TGFβ1- положительный рак

[398] С активностью TGFβ1 связаны различные виды рака, и их можно лечить с помощью антител и/или композиций согласно настоящему изобретению. При использовании в настоящем документе термин «рак» относится к любому из различных TGFβ1-положительных злокачественных новообразований, характеризующихся пролиферацией анапластических клеток, которые имеют тенденцию проникать в окружающие ткани и метастазировать в новые участки тела, а также относится к патологическому состоянию, характеризующемуся таким злокачественным неопластическим ростом. Раки могут быть локализованными (например, солидные опухоли) или системными. В контексте настоящего изобретения термин «локализованный» (как «локализованная опухоль») относится к анатомически изолированным или изолируемым аномалиям/поражениям, таким как солидные злокачественные новообразования, в отличие от системного заболевания (например, так называемых опухолей жидких тканей или раков крови). Некоторые раки, такие как определенные лейкозы (например, миелофиброз) и множественная миелома, например, могут характеризоваться как локализованным компонентом (например, костный мозг), так и системным компонентом (например, циркулирующие клетки крови) заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления раки могут быть системными, такими как гематологические злокачественные образования. Раки, которые можно лечить в

соответствии с настоящим изобретением, являются TGFβ1-положительными и включают без ограничения все типы лимфом/лейкозов, карцином и сарком, такие как раки или опухоли, обнаруживаемые в анальном отверстии, мочевом пузыре, желчных протоках, костях, головном мозге, молочной железе, шейке матки, толстой/прямой кишке, эндометрии, пищеводе, глазах, желчном пузыре, голове и шее, печени, почках, гортани, легких, средостении (грудной клетке), рте, яичниках, поджелудочной железе, половом члене, предстательной железе, коже, тонкой кишке, желудке, спинном мозге, копчике, яичках, щитовидной железе и матке. При раке TGFβ (например, TGFβ1) может либо стимулировать рост, либо ингибировать рост. Например, при раках поджелудочной железы опухоли с SMAD4 дикого типа могут испытывать ингибирование роста в ответ на TGFβ, но по мере прогрессирования заболевания обычно присутствует конститутивно активированный рецептор типа II. Кроме того, существуют раки поджелудочной железы с нулевым SMAD4. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, их антигенсвязывающие части и/или композиции согласно настоящему изобретению предназначены для селективного нацеливания на компоненты сигнальных путей TGFβ, которые функционируют уникальным образом при одной или нескольких формах рака. Лейкозы или раки крови или костного мозга, которые характеризуются аномальной пролиферацией белых клеток крови, то есть лейкоцитов, можно разделить на четыре основные классификационные группы, включающие острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый миелогенный лейкоз или острый миелоидный лейкоз (AML) (AML с транслокациями между хромосомами 10 и 11 [t(10, 11)], хромосомами 8 и 21 [t(8;21)], хромосомами 15 и 17 [t(15;17)] и инверсиями в хромосоме 16 [inv(16)]; AML с мультилинейной дисплазией, куда относятся пациенты, ранее перенесшие миелодиспластический синдром (MDS) или миелопролиферативное заболевание, которое трансформировалось в AML; AML и миелодиспластический синдром (MDS), связанные с терапией, куда относятся пациенты, которые ранее проходили химиотерапию и/или облучение и у которых впоследствии развился AML или MDS; d) AML, не относящийся к другим категориям, который включает подтипы AML, которые не попадают в вышеуказанные категории; и e) острые лейкозы неоднозначного происхождения, которые возникают, когда лейкозные клетки не могут быть классифицированы ни как миелоидные, ни как лимфоидные клетки, или когда присутствуют оба типа клеток); и хронический миелогенный лейкоз (CML).

[399] Изоформно-селективные ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению можно применять для лечения пациентов, страдающих хроническим миелоидным лейкозом, который представляет собой заболевание стволовых клеток, при

котором онкобелок BCR/ABL считается важным для аномального роста и накопления неопластических клеток. Иматиниб является одобренной терапией для лечения этого состояния; однако у значительной части пациентов с миелоидным лейкозом обнаруживается резистентность к иматинибу. Ингибирование TGFβ1, достигаемое ингибитором, таким как описанные в настоящем документе, может усиливать репопуляцию/размножение для противодействия вызываемому BCR/ABL аномальному росту и накоплению неопластических клеток, тем самым обеспечивая клиническую пользу.

[400] Изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, можно применять для лечения множественной миеломы. Множественная миелома представляет собой рак B-лимфоцитов (например, плазматических клеток, плазмобластов, B-клеток памяти), который развивается и разрастается в костном мозге, вызывая деструктивные поражения костей (то есть остеолитические поражения). Обычно заболевание проявляется усиленной остеокластической резорбцией кости, подавлением дифференцировки остеобластов (например, остановкой дифференцировки) и нарушением костеобразования, частично характеризующимся остеолитическими поражениями, остеопенией, остеопорозом, гиперкальциемией, а также плазмоцитомой, тромбоцитопенией, нейтропенией и невропатией. Терапия TGFβ1-селективным ингибитором, описанная в настоящем документе, может быть эффективной для улучшения одного или нескольких таких клинических проявлений или симптомов у пациентов. Ингибитор TGFβ1 можно вводить пациентам, получающим дополнительную терапию или терапию для лечения множественной миеломы, включая пациентов, перечисленных в другом месте настоящего документа. Согласно некоторым вариантам осуществления множественную миелому можно лечить ингибитором TGFβ1 в комбинации с ингибитором миостатина или ингибитором IL-6. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ1 можно применять в сочетании с традиционной терапией множественной миеломы, такой как бортезомиб, леналидомид, карфилзомиб, помалидомид, талидомид, доксорубицин, кортикостероиды (например, дексаметазон и преднизон), химиотерапия (например, мелфалан), лучевая терапия, трансплантация стволовых клеток, плитидепсин, элотузумаб, иксазомиб, маситиниб и/или панобиностат.

[401] Типы карцином, которые можно лечить способами согласно настоящему изобретению, включают без ограничения папиллому/карциному, хориокарциному, опухоль эндодермального синуса, тератому, аденому/аденокарциному, меланому, фиброму, липому, лейомиому, рабдомиому, мезотелиому, ангиому, остеому, хондрому, глиому, лимфому/лейкоз, плоскоклеточную карциному, мелкоклеточную карциному,

крупноклеточную недифференцированную карциному, базально-клеточную карциному и синоназальную недифференцированную карциному.

[402] Типы сарком включают без ограничения саркому мягких тканей, такую как альвеолярная саркома мягких тканей, ангиосаркому, дерматофибросаркому, десмоидную опухоль, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, экстраскелетную хондросаркому, экстраскелетную остеосаркому, фибросаркому, гемангиоперицитому, гемангиосаркому, саркому Капоши, лейомиосаркому, липосаркому, лимфангиосаркому, лимфосаркому, злокачественную фиброзную гистиоцитому, нейрофибросаркому, рабдомиосаркому, синовиальную саркому и опухоль Аскина, саркому Юинга (примитивную нейроэктодермальную опухоль), злокачественную гемангиоэндотелиому, злокачественную шванному, остеосаркому и хондросаркому.

[403] Изоформно-селективные ингибиторы активации TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, могут подходить для лечения злокачественных новообразований, затрагивающих клетки, происходящие из нервного гребня. Раки линии нервного гребня (то есть опухоли, происходящие из нервного гребня) включают, но без ограничения, меланому (рак меланоцитов), нейробластому (рак симпатоадреналовых предшественников), ганглионеврому (рак ганглиев периферической нервной системы), медуллярную карциному щитовидной железы (рак С-клеток щитовидной железы), феохромоцитому (рак хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников) и MPNST (рак шванновских клеток). Согласно некоторым вариантам осуществления антитела и способы согласно настоящему изобретению можно применять для лечения одного или нескольких типов рака или связанных с раком состояний, которые могут включать, но без ограничения, рак толстой кишки, рак почки, рак молочной железы, злокачественную меланому и глиобластомы (Schlingensiepen *et al.*, 2008. *Cancer Res.* 177: 137-50; Ouhtit *et al.*, 2013. *J Cancer*. 4 (7): 566-572).

[404] При том, что Treg играют важную роль в подавлении иммунных реакций у здоровых индивидуумов, повышенное количество Treg при раке связано с плохим прогнозом. Например, асцит рака яичников человека инфильтрирован Foxp3+ GARP+ Treg (Downs-Canner *et al.*, *Nat Commun.* 2017, 8: 14649). Аналогично, Treg положительно коррелируют с более иммунодепрессивным и более агрессивным фенотипом при распространенной гепатоклеточной карциноме (Kalathil *et al.*, *Cancer Res.* 2013, 73(8): 2435-44). Treg могут подавлять пролиферацию эффекторных Т-клеток. Кроме того, Treg проявляют контактно-зависимое ингибирование иммунных клеток (например, наивных CD4+ Т-клеток) посредством продуцирования TGFβ1. Следовательно, для борьбы с

опухолью выгодно ингибировать Treg, чтобы было доступно достаточное количество эффекторных Т-клеток для проявления противоопухолевой активности.

[405] Все больше данных свидетельствует о роли макрофагов в прогрессировании опухолей/рака. Настоящее изобретение охватывает представление о том, что это частично опосредовано активацией TGFβ1 в окружении заболевания, таком как TME. Моноциты, происходящие из костного мозга (например, CD11b+), рекрутируются в участки опухоли в ответ на цитокины/хемокины опухолевого происхождения (такие как CCL2, CCL3 и CCL4), где моноциты подвергаются дифференцировке и поляризации для приобретения проракового фенотипа (например, смещенные к M2 TAM или TAM-подобные клетки). Большинство TAM во многих опухолях смещены к M2. Обнаружено, что среди M2-подобных макрофагов подтипы M2c и M2d, но не M1, экспрессируют повышенный уровень LRRC33 на клеточной поверхности. Более того, макрофаги могут быть дополнительно изменены или активированы под воздействием M-CSF, что приводит к заметному увеличению экспрессии LRRC33, которая совпадает с экспрессией TGFβ1. Также наблюдали увеличение циркулирующего M-CSF (то есть, концентраций M-CSF в сыворотке) у пациентов с миелопролиферативным заболеванием (например, миелофиброзом). Как правило, опухоли с высоким инфильтратом макрофагов (TAM) и/или MDSC связаны с плохим прогнозом. Аналогично, повышенные уровни M-CSF также указывают на плохой прогноз.

[406] С другой стороны, инфильтрация макрофагов в опухоль также может свидетельствовать об эффективности терапии. Как показано на **фиг. 17A-17B** и **18A-18B**, опухоли, в которые эффективно проникают эффекторные Т-клетки (например, CD8+ Т-клетки) после лечения комбинацией ингибитора контрольных точек и не зависящего от контекста (или с предпочтением контекста) ингибитора TGFβ1, могут приводить к рекрутированию фагоцитирующих моноцитов/макрофагов, очищающих клеточный дебрис. Как ясно из **фиг. 17B**, комбинация анти-PD-1 и ингибитора TGFβ1приводит к сильному притоку CD8 Т-клеток по всей опухоли по сравнению с лечением только анти-PD-1. Одновременно наблюдается обширная инфильтрация опухоли F4/80-положительными макрофагами (смотри **фиг. 18B**). Это может указывать на то, что макрофаги удаляют дебрис раковых клеток, образованный цитотоксическими клетками, и, предположительно, является прямым следствием ингибирования TGFβ1.

[407] Как упомянуто выше, ингибиторы активации TGFβ1 можно применять в лечении меланомы. Типы меланомы, которые можно лечить такими ингибиторами, включают, но без ограничения, злокачественное лентиго; меланому типа злокачественного лентиго; поверхностно распространяющуюся меланому; акральную лентигинозную

меланому; меланому слизистых оболочек; узловатую меланому; полипоидную меланому и десмопластическую меланому. Согласно некоторым вариантам осуществления меланома представляет собой метастатическую меланому.

[408] В последнее время для эффективного лечения пациентов с распространенной меланомой стали использовать ингибиторы иммунных контрольных точек. В частности, антитела против молекулы запрограммированной смерти (PD)-1 (например, ниволумаб и пембролизумаб) в настоящее время стали стандартом лечения определенных типов рака, таких как распространенная меланома, и продемонстрировали значительную активность и длительный ответ с управляемым профилем токсичности. Однако эффективное клиническое применение антагонистов PD-1 сдерживается высоким уровнем врожденной резистентности (~60-70%) (смотри Hugo *et al.,* (2016) *Cell* 165: 35-44), что свидетельствует о том, что текущие проблемы продолжают включать вопросы отбора пациентов и предикторов 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-1-терапию, в конечном итоге развивалась приобретенная резистентность (Ribas *et al.,* (2016) *JAMA* 315: 1600-9).

[409] Количество инфильтрирующих опухоль CD8+ Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и/или CTLA-4, является, по-видимому, ключевым показателем успеха ингибирования контрольных точек, а блокада как PD-1, так и CTLA-4 может увеличивать количество инфильтрирующих Т-клеток. У пациентов с более высоким содержанием опухолеассоциированных макрофагов, однако, противораковые эффекты клеток CD8 могут быть подавлены.

[410] Предполагается, что экспрессирующие LRRC33 клетки, такие как миелоидные клетки, включая 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), таких как CD4 и/или CD8 Т-клетки, что может по меньшей мере частично лежать в основе наблюдаемой резистентности к анти-PD-1 в некоторых популяциях пациентов. Действительно, данные свидетельствуют о том, что резистентность к анти-PD-1-монотерапии отмечена неспособностью накапливать цитотоксические CD8+ Т-клетки и снижением отношения Teff/Treg. Стоит отметить, что авторы настоящего изобретения обнаружили, что среди некоторых раковых пациентов, таких как популяция пациентов с меланомой, существует бифуркация в отношении уровней экспрессии LRRC33: одна группа демонстрирует высокую экспрессию LRRC33 ($LRRC33^{high}$), тогда как другая группа

демонстрирует относительно низкую экспрессию LRRC33 ($LRRC33^{low}$). Таким образом, настоящее изобретение включает представление о том, что популяция пациентов $LRRC33^{high}$ может представлять плохо реагирующих на терапию ингибиторами иммунных контрольных точек или резистентных к ней пациентов. Соответственно, средства, которые ингибируют LRRC33, такие как описанные в настоящем документе, могут быть особенно полезными для лечения рака, такого как меланома, лимфома и миелопролиферативные нарушения, которые резистентны к терапии ингибиторами контрольных точек (например, анти-PD-1).

[411] Согласно некоторым вариантам осуществления рак/опухоль по своей природе резистентны или невосприимчивы к ингибитору иммунных контрольных точек. Если привести только один пример, оказывается, что некоторые лимфомы плохо реагируют на ингибирование иммунных контрольных точек, такое как анти-PD-1-терапия. Аналогично, известно, что подгруппа популяции пациентов с меланомой демонстрирует резистентность к ингибиторам иммунных контрольных точек. Без ограничения конкретной теорией авторы настоящего изобретения предполагают, что это может быть по меньшей мере частично связано с повышающей регуляцией сигнальных путей TGFβ1, что может создавать иммуносупрессивное микроокружение, в котором ингибиторы контрольных точек не могут проявлять свое действие. Ингибирование TGFβ1 может делать такой рак более восприимчивым к терапия ингибиторами контрольных точек. Неограничивающие примеры типов рака, которые могут получать пользу от комбинации ингибитора иммунных контрольных точек и ингибитора TGFβ1, включают миелофиброз, меланому, почечно-клеточную карциному, рак мочевого пузыря, рак толстой кишки, гематологические злокачественные образования, немелкоклеточную карциному, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), лимфому (классическую ходжкинскую и неходжкинскую), рак головы и шеи, уротелиальный рак, рак с высокой микросателлитной нестабильностью, рак с дефицитом репарации неспаренных оснований, рак желудка, рак почки и гепатоклеточный рак. Однако любой рак (например, пациентов с таким раком), при котором TGFβ1 сверхэкспрессирован или является доминирующей изоформой по сравнению с TGFβ2/3, как определено, например, с помощью биопсии, можно лечить изоформно-селективным ингибитором TGFβ1 согласно настоящему изобретению.

[412] Согласно некоторым вариантам осуществления рак/опухоль со временем становится резистентным. Это явление называется приобретенной резистентностью или адаптивной резистентностью. Как и истинная резистентность, согласно некоторым вариантам осуществления приобретенная резистентность по меньшей мере частично опосредована TGFβ1-зависимыми путями, и изоформно-специфичные ингибиторы TGFβ1,

описанные в настоящем документе, могут быть эффективны для восстановления противоракового иммунитета в этих случаях.

[413] Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированная терапия, содержащая ингибитор иммунных контрольных точек и изоформно-специфичный ингибитор TGFβ1, который нацелен на комплекс LRRC33-proTGFβ1 (такой как описанные в настоящем документе), может быть эффективна для лечения такого рака. Кроме того, высокий уровень инфильтрата LRRC33-положительных клеток в опухолях или иных местах/тканях с аномальной клеточной пролиферацией может служить биомаркером иммуносупрессии хозяина и резистентности к иммунным контрольным точкам. Аналогично, эффекторные Т-клетки могут быть исключены из иммуносупрессивной ниши, которая ограничивает способность организма бороться с раком. Более того, как показано ниже в разделе примеров, Treg, которые экспрессируют GARP-презентируемый TGFβ1, подавляют пролиферацию эффекторных Т-клеток. В итоге, TGFβ1, вероятно, является ключевым фактором в создании и поддержании иммуноингибирующего микроокружения заболевания (такого как TME), и многие контексты презентации TGFβ1 имеют отношение к опухолям. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированная терапия может достигать более благоприятных соотношений Teff/Treg.

[414] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, как описано в настоящем документе, можно применять в способах лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, причем упомянутый способ предусматривает введение антитела или его антигенсвязывающей части субъекту таким образом, что рак подвергается лечению. Согласно конкретным вариантам осуществления рак представляет собой рак толстой кишки.

[415] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящем документе, можно применять в способах лечения солидных опухолей. Согласно некоторым вариантам осуществления солидные опухоли могут представлять собой десмопластические опухоли, которые обычно являются плотными и трудными для проникновения терапевтических молекул. Воздействуя на компонент ECM таких опухолей, такие антитела могут «разрыхлять» плотную опухолевую ткань и разрушать ее, облегчая терапевтический доступ для проявления своих противораковых эффектов. Таким образом, можно применять в комбинации дополнительные терапевтические средства, такие как любые известные противоопухолевые лекарственные средства. Согласно предпочтительным вариантам

осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[416] Дополнительно или альтернативно, изоформно-специфичные антитела или их фрагменты, которые способны ингибировать активацию TGFβ1, такие как раскрытые в настоящем документе, можно применять в сочетании с технологией Т-клеток с химерными антигенными рецепторами («CAR-T») в качестве клеточной иммунотерапии, такой как иммунотерапия рака для борьбы с раком.

[417] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящем документе, можно применять в способах ингибирования или уменьшения роста солидной опухоли у субъекта с солидной опухолью, причем упомянутый способ предусматривает введение антитела или его антигенсвязывающей части субъекту, так что рост солидной опухоли ингибируется или уменьшается. Согласно конкретным вариантам осуществления солидная опухоль представляет собой опухоль карциномы толстой кишки. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, применимые для лечения рака, представляют собой изоформно-специфичный ингибитор активации TGFβ1.

[418] Настоящее изобретение относится к применению изоформно-специфичных ингибиторов TGFβ1, описанных в настоящем документе, в лечении рака, включающего солидную опухоль, у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления такой изоформно-специфичный ингибитор может ингибировать активацию TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления солидная опухоль характеризуется наличием стромы, обогащенной CD8+ Т-клетками, непосредственно контактирующими с CAF и коллагеновыми волокнами. Такая опухоль может создавать иммуносупрессивное окружение, которое препятствует эффективной инфильтрации противоопухолевых иммунных клеток (например, эффекторных Т-клеток) в опухоль, ограничивая способность организма бороться с раком. Вместо этого такие клетки могут накапливаться внутри или вблизи стромы опухоли. Эти особенности могут приводить к тому, что такие опухоли плохо реагируют на терапию ингибиторами иммунных контрольных точек. Как рассмотрено выше подробнее, ингибиторы TGFβ1, раскрытые в настоящем документе, могут разблокировать супрессию, чтобы позволять эффекторным клеткам достигать и уничтожать раковые клетки, например, при использовании в сочетании с ингибитором иммунных контрольных точек. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46,

Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[419] Предполагается, что TGFβ1 играет различные роли в опухолевом микроокружении, включая рост опухоли, подавление иммунитета хозяина, пролиферацию злокачественных клеток, васкуляризацию, ангиогенез, миграцию, инвазию, метастазирование и химиорезистентность. Таким образом, каждый «контекст» презентирования 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 опосредования иммунного ответа хозяина для борьбы с раковыми клетками. Ось LTBP1/3 может регулировать ECM, включая строму, где рак-ассоциированные фибробласты (CAF) играют роль в патогенезе и прогрессировании рака. Ось LRRC33 может играть решающую роль в рекрутировании циркулирующих моноцитов в опухолевое микроокружение, последующей дифференцировке в опухолеассоциированные макрофаги (TAM), инфильтрации в ткань опухоли и обострении заболевания.

[420] Опухолевое микроокружение (TME) содержит клетки нескольких типов, экспрессирующих TGFβ1, таких как активированные миофибробласт-подобные фибробласты, стромальные клетки, инфильтрирующие макрофаги, MDSC и другие иммунные клетки, в дополнение к раковым (то есть, злокачественным) клеткам. Таким образом, TME представляет собой гетерогенную популяцию клеток, экспрессирующих и/или реагирующих на TGFβ1, но в ассоциации с более чем одним типом презентирующих молекул, например LTBP1, LTBP3, LRRC33 и GARP, в нише.

[421] В последнее время было введено в употребление понятие явления «исключения иммунного ответа» для описания опухолевого окружения, из которого удалены (следовательно, «исключены») локальными иммуносупрессивными стимулами противоопухолевые эффекторные Т-клетки (например, CD8+ Т-клетки), и считается, что TGFβ по крайней мере частично опосредует этот процесс. В исключающей иммунный ответ опухоли эффекторные клетки, которые в противном случае были бы способны атаковать раковые клетки путем распознавания опухолевых антигенов клеточной поверхности, не могут получить доступ к очагу раковых клеток. Таким образом, раковые клетки ускользают от иммунитета хозяина и иммуноонкологических терапевтических средств, таких как ингибиторы контрольных точек, которые используют такой иммунитет и полагаются на него. Действительно, такие опухоли демонстрируют резистентность к ингибированию контрольных точек, такому как анти-PD-1 и анти-PD-L1 антитела, вероятно потому, что

проникновение в опухоль Т-клеток-мишеней заблокировано, и поэтому они не могут оказывать противораковое действие.

[422] Появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что TGFβ может быть основным игроком в создании и/или поддержании иммуносупрессии в пораженных тканях, включая исключающее иммунный ответ окружение опухоли. Поэтому ингибирование TGFβ может разблокировывать иммуносупрессию и позволять эффекторным Т-клеткам (в частности, цитотоксическим CD8+ Т-клеткам) получать доступ и уничтожать раковые клетки-мишени. Помимо инфильтрации опухоли, ингибирование TGFβ может также способствовать размножению CD8+ Т-клеток. Хотя точный механизм, лежащий в основе этого процесса, еще предстоит выяснить, предполагают, что иммуносупрессия по крайней мере частично опосредована активацией ассоциированного с иммунными клетками TGFβ1 при участии регуляторных Т-клеток и активированных макрофагов. Сообщалось, что TGFβ непосредственно стимулирует экспрессию Foxp3 в CD4+ Т-клетках, тем самым превращая их в регуляторный фенотип (то есть Treg). Более того, Treg подавляют пролиферацию эффекторных Т-клеток (смотри, например, **фиг. 26**), тем самым снижая иммунный ответ. Показано, что этот процесс является TGFβ1-зависимым и, вероятно, связан с GARP-ассоциированной TGFβ1-сигнализацией. Наблюдения как на людях, так и в моделях на животных показали, что увеличение количества Treg в TME связано с плохим прогнозом при многих типах рака. Кроме того, заявитель ранее показал, что M2-поляризованные макрофаги, подвергающиеся воздействию факторов опухолевого происхождения, таких как M-CSF, резко повышающе регулируют экспрессию на клеточной поверхности LRRC33, который представляет собой презентирующую молекулу для TGFβ1 (смотри, например, PCT/US2018/031759). Полагают, что эти так называемые опухолеассоциированные макрофаги (или TAM) способствуют наблюдаемой TGFβ1-зависимой иммуносупрессии в TME и стимулируют рост опухоли.

[423] Ряд солидных опухолей характеризуется наличием стромы опухоли, обогащенной миофибробластами или миофибробласт-подобными клетками. Эти клетки продуцируют коллагеновый матрикс, который окружает или покрывает опухоль (например, как десмоплазия), что по меньшей мере частично может быть вызвано сверхактивной TGFβ1-сигнализацией. Предполагают, что активация TGFβ1 опосредована ECM-ассоциированными презентирующими молекулами, например LTBP1 и LTBP3, в строме опухоли.

[424] Согласно некоторым вариантам осуществления TGFβ1-экспрессирующие клетки инфильтрируют опухоль, создавая локальное иммуносупрессивное окружение.

Степень, в которой наблюдается такая инфильтрация, может коррелировать с худшим прогнозом. Согласно некоторым вариантам осуществления более высокая инфильтрация свидетельствует о более слабом ответе на другую терапию рака, такую как ингибиторы иммунных контрольных точек. Согласно некоторым вариантам осуществления TGFβ1-экспрессирующие клетки в опухолевом микроокружении содержат Treg и/или миелоидные клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления миелоидные клетки включают, но без ограничения, макрофаги, моноциты (тканевые резидентные или происходящие из костного мозга) и MDSC.

[425] Согласно некоторым вариантам осуществления LRRC33-экспрессирующие клетки в TME представляют собой супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC). Инфильтрация MDSC (например, инфильтрат солидной опухоли) может лежать в основании по меньшей мере одного механизма иммунного ускользания, создавая иммуносупрессивную нишу, из которой исключаются противоопухолевые иммунные клетки хозяина. Данные свидетельствуют о том, что MDSC мобилизуются сигналами, связанными с воспалением, такими как опухолеассоциированные воспалительные факторы. После мобилизации MDSC могут влиять на иммуносупрессивные эффекты, повреждая клетки, борющиеся с заболеванием, такие как CD8+ Т-клетки и NK-клетки. Кроме того, MDSC могут индуцировать дифференцировку Treg посредством секреции TGFβ и IL-10. Таким образом, изоформно-специфичный ингибитор TGFβ1, такой как описанные в настоящем документе, можно вводить пациентам с иммунным ускользанием (например, с нарушением иммунного надзора) для восстановления или усиления способности организма бороться с заболеванием (таким как опухоль). Как более подробно описано в настоящем документе, это может дополнительно повышать (например, восстанавливать или усиливать) реагирование организма или чувствительность другой терапии, такой как терапия рака.

[426] Согласно некоторым вариантам осуществления, повышенная плотность (например, количество) циркулирующих MDSC у пациентов является прогностическим признаком плохого реагирования на терапию блокадой контрольных точек, например антагонистами PD-1 и антагонистами PD-L1. Например, исследования биомаркеров показали, что циркулирующие до лечения супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) HLA-DR lo/CD14+/CD11b+ связаны с прогрессированием и ухудшением OS ($p = 0,0001$ и $0,0009$). Кроме того, резистентность к блокаде контрольных точек PD-1 при воспалительной карциноме головы и шеи (HNC) связана с экспрессией GM-CSF и маркеров супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC). Это наблюдение подтверждает, что стратегии истощения MDSC, такие как химиотерапия, следует рассматривать в комбинации или последовательно с анти-PD-1. LRRC33 или

комплексы LRRC33-TGFβ представляют собой новую мишень для иммунотерапии рака благодаря селективной экспрессии на иммуносупрессивных миелоидных клетках. Поэтому, без ограничения конкретной теорией, нацеливание на этот комплекс может повышать эффективность стандартной терапии ингибиторами контрольных точек в популяции пациентов.

[427] Настоящее изобретение, таком образом, относится к применению изоформно-специфичныого ингибитора TGFβ1, описанного в настоящем документе, для лечения рака, который включает солидную опухоль. Такое лечение предусматривает введение изоформно-специфичного ингибитора TGFβ1 субъекту, у которого диагностирован рак, который включает по меньшей мере одну локализованную опухоль (солидную опухоль), в количестве, эффективном для лечения рака. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[428] Данные свидетельствуют о том, что прогрессирование рака (например, пролиферация/рост, инвазия, ангиогенез и метастазирование опухоли) может быть по меньшей мере частично обусловлено взаимодействием опухоль-строма. В частности, CAF могут способствовать этому процессу посредством секреции различных цитокинов и факторов роста и ремоделирования ECM. Факторы, участвующие в этом процессе, включают, но без ограничения, стромально-клеточный фактор 1 (SCD-1), MMP2, MMP9, MMP3, MMP-13, TNF-α, TGFβ1, VEGF, IL-6, M-CSF. Кроме того, CAF могут рекрутировать TAM, секретируя такие факторы, как CCL2/MCP-1 и SDF-1/CXCL12, в очаг опухоли; после этого создается про-TAM ниша (например, обогащенные гиалуронаном участки стромы), где TAM преимущественно прикрепляются. Поскольку предполагается, что TGFβ1 стимулирует активацию нормальных фибробластов в миофибробласт-подобные CAF, введение изоформно-специфичного ингибитора TGFβ1, такого как описанные в настоящем документе, может быть эффективным для противодействия стимулирующей рак активности CAF. Действительно, данные, представленные в настоящем документе, позволяют предположить, что изоформно-специфичное антитело, которое блокирует активацию TGFβ1, может ингибировать UUO-индуцированную повышающую регуляцию маркерных генов, таких как CCL2/MCP-1, α-SMA. FN1 и Col1, которые также связаны со многими видами рака.

[429] Согласно конкретным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящем документе, вводят субъекту с раком или опухолью или отдельно, или в комбинации с дополнительным средством, например

анти-PD-1 антителом (например, анти-PD-1 антагонистом). Другими комбинированными терапиями, которые включены в настоящее изобретение, являются введение антитела или его антигенсвязывающей части, описанной в настоящем документе, с облучением или химиотерапевтическим средством. Примеры дополнительных средств включают без ограничения антагонист PD-1, антагонист PD-L1, белок слияния PD-L1 или PD-L2, антагонист CTLA4, агонист GITR, анти-ICOS антитело, анти-ICOSL антитело, анти-B7H3 антитело, анти-B7H4 антитело, анти-TIM3 антитело, анти-LAG3 антитело, анти-OX40 антитело, анти-CD27 антитело, анти-CD70 антитело, анти-CD47 антитело, анти-41BB антитело, анти-PD-1 антитело, анти-CD20 антитело, онколитический вирус и ингибитор PARP.

[430] Согласно некоторым вариантам осуществления определение или выбор терапевтического подхода для комбинированной терапии, которая подходит для конкретных типов рака или популяции пациентов, может включать следующее: a) рассмотрение типов рака, для которых доступна стандартная терапия (например, одобренные показания к иммунотерапии); b) рассмотрение резистентных к лечению субпопуляций; и c) рассмотрение раков/опухолей, которые «активны в отношении пути TGFβ1» или иным образом по меньшей мере частично являются TGFβ1-зависимыми (например, чувствительны к ингибированию TGFβ1). Например, многие образцы рака показывают, что TGFβ1 является преобладающей изоформой, например в анализе TCGA RNAseq. Согласно некоторым вариантам осуществления более 50% (например, более 50%, 60%, 70%, 80% и 90%) образцов из каждого типа опухоли являются положительными в отношении экспрессии изоформы TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления раки/опухоли, которые «активны в отношении пути TGFβ1» или иным образом по меньшей мере частично являются TGFβ1-зависимыми (например, чувствительны 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.

[431] Согласно некоторым вариантам осуществления изоформно-специфичный ингибитор TGFβ1 вводят в сочетании с терапией ингибированием контрольных точек пациентам, у которых диагностирован рак, для которого одна или несколько терапий ингибиторами контрольных точек одобрена или показала эффективность. К ним относятся, но без ограничения, уротелиальная карцинома мочевого пузыря, плоскоклеточная карцинома (например, головы и шеи), светлоклеточная карцинома почки, папиллярно-клеточная карцинома почки, гепатоклеточная карцинома печени, аденокарцинома легкого, меланома кожи и аденокарцинома желудка. Согласно предпочтительным вариантам

осуществления такие пациенты плохо реагируют или не реагируют на терапию ингибиторами контрольных точек. Согласно некоторым вариантам осуществления плохое реагирование обусловлено первичной резистентностью. Согласно некоторым вариантам осуществления рак, который резистентен к блокаде контрольных точек, демонстрирует понижающую регуляцию экспрессии TCF7. Согласно некоторым вариантам осуществления понижающая регуляция TCF7 в резистентной к ингибированию контрольных точек опухоли может коррелировать с низким количеством внутриопухолевых CD8+ Т-клеток. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[432] Изоформно-специфичный ингибитор TGFβ1 можно применять в лечении резистентных к химиотерапии или лучевой терапии раков. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления изоформно-специфичный ингибитор TGFβ1 вводят пациентам, у которых диагностирован рак, по поводу которого они получают или получали химиотерапию и/или лучевую терапию. В частности, применение ингибитора TGFβ1 выгодно, когда рак (пациент) резистентны к такой терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления такой рак содержит покоящиеся опухоль-генерирующие раковые клетки (TPC), в которых TGFβ-сигнализация контролирует их обратимое вхождение в состояние остановки роста, что защищает TPC от химиотерапии или лучевой терапии. Предполагают, что при фармакологическом ингибировании TGFβ1 TPC с нарушениями не могут войти в состояние покоя и, таким образом, становятся восприимчивыми к химиотерапии и/или лучевой терапии. К таким ракам относятся различные карциномы, например плоскоклеточные карциномы. Смотри, например, Brown et al., (2017) “TGF-β-Induced Quiescence Mediates Chemoresistance of Tumor-Propagating Cells in Squamous Cell Carcinoma.” *Cell Stem Cell*. 21(5):650-664.

Состояния, которые получают пользу от регенерации тканей и репопуляции стволовых клеток

[433] Данные свидетельствуют о том, что TGFβ1 играет роль в регуляции гомеостаза различных популяций стволовых клеток и их дифференцировке/репопуляции в ткани. Во время гомеостаза тканеспецифические стволовые клетки находятся преимущественно в состоянии покоя, но при определенном стрессе запускаются для включения в клеточный цикл. Полагают, что TGFβ1 функционирует как «остановка» во время этого процесса, которая жестко регулирует дифференцировку и восстановление стволовых клеток, а стресс, который запускает начало клеточного цикла, совпадает с ингибированием TGFβ1, которое устраняет «остановку». Таким образом, предполагают, что изоформно-селективные

ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, можно применять для изменения или корректировки клеточного цикла и решения о входе в G0 у стволовых клеток/клеток-предшественников в конкретной ткани.

[434] Соответственно авторы настоящего изобретения рассматривают применение изоформно-селективных ингибиторов TGFβ1 при состояниях, при которых: i) дифференцировка/восстановление стволовых клеток/клеток-предшественников остановлена или нарушена из-за заболевания или индуцирована как побочный эффект терапии/приема лекарственных средств; ii) пациенты проходят терапию или прием лекарственных средств, которые вызывают гибель или истощение здоровых клеток; iii) пациенты могут получать пользу от усиленной дифференцировки/восстановления стволовых клеток/клеток-предшественников; iv) заболевание связано с аномальными дифференцировкой или восстановлением стволовых клеток.

[435] Например, мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (MSC) представляют собой небольшую популяцию стромальных клеток, присутствующих в большинстве соединительных тканей взрослых, таких как костный мозг, жировая ткань и пуповинная кровь. MSC поддерживаются в состоянии относительного покоя *in vivo*, но в ответ на различные физиологические и патологические стимулы способны пролиферировать, а затем дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, адипоциты или другие линии мезодермального типа, такие как гладкомышечные клетки (SMC) и кардиомиоциты. Несколько сигнальных сетей организуют дифференцировку MSC в функциональные мезенхимальные линии, в которых TGF-β1 стал ключевым игроком (рассмотрено, например, в Zhao & Hantash (2011). *Vitam Horm* 87:127-41).

[436] Аналогично, гемопоэтические стволовые клетки необходимы для пожизненного продуцирования клеток крови; чтобы предотвратить истощение, большинство гемопоэтических стволовых клеток остаются в состоянии покоя во время стационарного гемопоэза. Однако во время гематологического стресса эти клетки быстро рекрутируются в клеточный цикл и подвергаются экстенсивному самообновлению и дифференцировке для удовлетворения повышенных гемопоэтических потребностей. TGFβ1 может работать как «переключатель» для управления переходом/балансом покой-репопуляция.

[437] Таким образом, изоформно-селективные ингибиторы TGFβ1 можно применять в лечении состояний, связанных с дефектами гемопоэтических стволовых клеток и недостаточностью костного мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления истощение или нарушение резервуара гемопоэтических стволовых клеток приводит к гемопоэтической недостаточности или гематологическим злокачественным образованиям.

Согласно некоторым вариантам осуществления такие состояния представляют собой нарушение репарации ДНК, характеризующееся прогрессирующей недостаточностью костного мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления такое состояние вызвано потерями стволовых клеток и клеток-предшественников. Согласно некоторым вариантам осуществления такие состояния связаны с анемией. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

Состояния, связанные с индуцированной лечением гемопоэтической дисрегуляцией

[438] Признано, что некоторые лекарственные средства, которые предназначены для лечения различных болезненных состояний, часто индуцируют или усугубляют у получающих лечение пациентов анемию (например, индуцированную лечением или лекарственным средством анемию, такую как индуцированная химиотерапией анемия и индуцированная лучевой терапией анемия). Согласно некоторым вариантам осуществления пациент получает миелосупрессивное лекарственное средство, которое может вызывать побочные эффекты, которые включают анемию. Такой пациент может получать пользу от фармакологического ингибирования TGFβ1 для усиления гемопоэза. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ1 может стимулировать гемопоэз у пациентов, предотвращая переход в состояние покоя. Согласно некоторым вариантам осуществления пациент может получать терапию G-CSF (например, филграстим).

[439] Соответственно, настоящее изобретение относится к применению изоформно-селективного ингибитора TGFβ1, такого как раскрытые в настоящем документе, для введения пациентам, получающим миелосупрессивную терапию (например, терапию с побочными эффектами, включающими миелосупрессивное действие). Примеры миелосупрессивной терапии включают, но без ограничения: пегинтерферон альфа-2a, интерферон альфа-n3, пегинтерферон альфа-2b, альдеслейкин, гемтузумаб озогамицин, интерферон альфакон-1, ритуксимаб, ибритумомаб тиуксетан, тозитумомаб, алемтузумаб, бевацизумаб, L-фенилаланин, бортезомиб, кладрибин, кармустин, амсакрин, хлорамбуцил, ралтитрексед, митомицин, бексаротен, виндезин, флоксуридин, тиогуанин, винорелбин, дексразоксан, сорафениб, стрептозоцин, гемцитабин, тенипозид, эпирубицин, хлорамфеникол, леналидомид, альтретамин, зидовудин, цисплатин, оксалиплатин, циклофосфамид, фторурацил, пропилтиоурацил, пентостатин, метотрексат, карбамазепин, винбластин, линезолид, иматиниб, клофарабин, пеметрексед, даунорубицин, иринотекан, метимазол, этопозид, дакарбазин, темозоломид, такролимус, сиролимус, мехлорэтамин, азацитидин, карбоплатин, дактиномицин, цитарабин, доксорубицин, гидроксимочевина,

бусульфан, топотекан, меркаптопурин, талидомид, мелфалан, флударабин, флуцитозин, капецитабин, прокарбазин, триоксид мышьяка, идарубицин, ифосфамид, митоксантрон, ломустин, паклитаксел, доцетаксел, дазатиниб, децитабин, неларабин, эверолимус, вориностат, тиотепа, иксабепилон, нилотиниб, белиностат, трабектедин, трастузумаб эмтанзин, темсиролимус, бозутиниб, бендамустин, кабазитаксел, эрибулин, руксолитиниб, карфилзомиб, тофацитиниб, понатиниб, помалидомид, обинутузумаб, тедизолида фосфат, блинатумомаб, ибрутиниб, палбоциклиб, олапариб, динутуксимаб и колхицин.

[440] Дополнительные показания могут включать любые из описанных в патенте США № 8871209, патенте США № 8415459 или международной публикации № WO 2011/151432, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

[441] Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитела, их антигенсвязывающие части и композиции согласно настоящему изобретению можно применять для лечения широкого спектра заболеваний, нарушений и/или состояний, связанных с TGFβ1-сигнализацией. Согласно некоторым вариантам осуществления целевые ткани/клетки предпочтительно экспрессируют изоформу TGFβ1 по сравнению с другими изоформами. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам лечения такого состояния, связанного с экспрессией TGFβ1 (например, дисрегуляцией TGFβ1-сигнализации и/или повышающей регуляцией экспрессии TGFβ1), с использованием фармацевтической композиции, которая содержит антитело или его антигенсвязывающую часть, описанные в настоящем документе.

[442] Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание связано с TGFβ1, ассоциированным с различными клеточными источниками (например, присутствующим на них или депонированным из них). Согласно некоторым вариантам осуществления такое заболевание связано как с иммунным компонентом, так и с ECM-компонентом функции TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления такое заболевание связано с: i) дисрегуляцией ECM (например, сверхпродукцией/депонированием компонентов ECM, таких как коллагены и протеазы; изменением жесткости субстрата ECM; аномальной или патологической активацией или дифференцировкой фибробластов, таких как миофибробласты и CAF); ii) иммунной супрессией из-за увеличения количества Treg и/или подавления эффекторных Т-клеток (Teff), например повышенным соотношением Treg/Teff; увеличением лейкоцитарного инфильтрата (например, макрофагов и MDSC), который вызывает подавление CD4 и/или CD8 Т-клеток; и/или iii) аномальной или патологической активацией, дифференцировкой и/или рекрутированием миелоидных клеток, таких как макрофаги (например, происходящие из костного мозга моноциты/макрофаги и тканевые

резидентные макрофаги), моноциты, супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC), нейтрофилы, дендритные клетки и NK-клетки.

[443] Согласно некоторым вариантам осуществления состояние связано с TGFβ1, презентируемым более чем одним типом презентирующих молекул (например, двумя или более из GARP, LRRC33, LTBP1 и/или LTBP3). Согласно некоторым вариантам осуществления пораженные ткани/органы/клетки, которые включают TGFβ1 из нескольких клеточных источников. Если привести только один пример, солидная опухоль (которая может также включать пролиферативное заболевание, связанное с костным мозгом, например миелофиброз и множественную миелому) может включать TGFβ1 из нескольких источников, таких как раковые клетки, стромальные клетки, окружающие здоровые клетки и/или инфильтрирующие иммунные клетки (например, CD45+ лейкоциты), включающих различные типы презентирующих молекул. Соответствующие иммунные клетки включают, но без ограничения, миелоидные клетки и лимфоидные клетки, например нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, лимфоциты (например, B-клетки, T-клетки и NK-клетки) и моноциты.

Схема и введение лечения

[444] Для применения на практике способов, раскрытых в настоящем документе, эффективное количество фармацевтической композиции, описанной выше, можно вводить нуждающемуся в лечении субъекту (например, человеку) подходящим путем, таким как внутривенное введение, например в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, внутримышечным, внутрибрюшинным, интрацереброспинальным, подкожным, внутрисуставным, интрасиновиальным, интратекальным, пероральным, ингаляционным или местным путем. Для введения пригодны коммерчески доступные распылители для жидких составов, включая струйные распылители и ультразвуковые распылители. Жидкие составы можно распылять непосредственно, а лиофилизированный порошок можно распылять после восстановления. В качестве альтернативы, антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, можно распылять с использованием фторуглеродного состава и дозирующего ингалятора или вдыхать в виде лиофилизированного и измельченного порошка.

[445] Субъект, подвергаемый лечению с помощью способов, описанных в настоящем документе, может представлять собой млекопитающее, более предпочтительно человека. Млекопитающие включают без ограничения сельскохозяйственных животных, спортивных животных, домашних животных, приматов, лошадей, собак, кошек, мышей и

крыс. Субъектом-человеком, который нуждается в лечении, может быть пациент-человек с наличием, с риском или с подозрением на наличие связанного с TGFβ1 показания, такого как указанные выше. Субъект с наличием связанного с TGFβ1 показания может быть идентифицирован с помощью обычного медицинского обследования, например лабораторных тестов, функциональных тестов органов, КТ-сканирования, МРТ или ультразвукового исследования. Субъект с подозрением на наличие любого из таких показаний может проявлять один или несколько симптомов показания. Субъект с риском показания может представлять собой субъекта с одним или несколькими из факторов риска для этого показания.

[446] При использовании в настоящем документе термины «эффективное количество» и «эффективная доза» относятся к любым количеству или дозе соединения или композиции, которых достаточно для выполнения их предполагаемой цели(ей), то есть для желаемого биологического или медицинского ответа ткани или субъекта при приемлемом соотношении польза/риск. Например, согласно конкретным вариантам осуществления настоящего изобретения предполагаемой целью может быть ингибирование активации TGFβ-1 *in vivo* для достижения клинически значимого результата, связанного с ингибированием TGFβ-1. Эффективные количества могут меняться, как ясно специалистам в данной области техники, в зависимости от конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, индивидуальных параметров пациента, включая возраст, физическое состояние, размер, пол и вес, продолжительности лечения, характера сопутствующей терапии (если таковая имеется), конкретного способа введения и подобных факторов в пределах знаний и опыта практикующего врача. Эти факторы хорошо известны рядовым специалистам в данной области техники, и для их рассмотрения достаточно рутинных экспериментов. Обычно предпочтительно использовать максимальную дозу отдельных компонентов или их комбинаций, то есть наивысшую безопасную дозу согласно здравому медицинскому заключению. Однако рядовым специалистам в данной области техники будет понятно, что пациент может настаивать на более низкой дозе или на переносимой дозе по медицинским причинам, психологическим причинам или практически любым другим причинам.

[447] Эмпирические соображения, такие как период полужизни, обычно способствуют определению дозировки. Например, антитела, совместимые с иммунной системой человека, такие как гуманизированные антитела или полностью человеческие антитела, можно применять для продления периода полужизни антитела и предотвращения атаки на антитело со стороны иммунной системой хозяина. Частота введения может быть определена и скорректирована в ходе терапии и обычно, но не обязательно, основана на

лечении, и/или подавлении, и/или улучшении, и/или задержке связанного с TGFβ1 показания. В качестве альтернативы, подходящими могут быть составы с замедленным непрерывным высвобождением антитела, которое специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1. Специалисту в данной области техники будут очевидны различные составы и устройства для достижения замедленного высвобождения, и они входят в объем настоящего раскрытия.

[448] В одном примере дозы антитела, которое специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, как описано в настоящем документе, могут быть эмпирически определены у индивидуумов, которые получили одно или несколько введений антитела. Индивидуумы получают возрастающие дозы антагониста. Для оценки эффективности можно следить за индикатором связанного с TGFβ1 показания. Например, способы измерения повреждения миофибрилл, восстановления миофибрилл, уровней воспаления в мышцах и/или уровней фиброза в мышцах хорошо известны рядовым специалистам в данной области техники.

[449] Настоящее изобретение охватывает признание того, что средства, способные модулировать стадию активации TGFβ изоформно-специфическим образом, могут обеспечивать улучшенные профили безопасности при использовании в качестве лекарственного препарата. Соответственно, настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с низкой скоростью диссоциации и ингибируют активацию TGFβ1, но не TGFβ2 или TGFβ3, тем самым вызывая специфическое ингибирование TGFβ1-сигнализации *in vivo* при минимизации нежелательных побочных эффектов от воздействия на сигнализацию TGFβ2 и/или TGFβ3. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[450] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящем документе, не являются токсичными при введении субъекту. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящем документе, демонстрируют пониженную токсичность при введении субъекту по сравнению с антителом, которое специфически связывается как с TGFβ1, так и с TGFβ2. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящем документе, демонстрируют пониженную токсичность при введении субъекту по сравнению

с антителом, которое специфически связывается как с TGFβ1, так и с TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящем документе, демонстрируют пониженную токсичность при введении субъекту по сравнению с антителом, которое специфически связывается с TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3.

[451] Как правило, для введения любого из антител, описанных в настоящем документе, начальная возможная дозировка может составлять приблизительно 1-20 мг/кг на введение, например еженедельно, каждые 2 недели, каждые 3 недели, ежемесячно и так далее. Например, пациенты могут получать инъекции приблизительно 1-10 мг/кг за 1 неделю, за 2 недели, за 3 недели или за 4 недели и так далее в количестве, эффективном для лечения заболевания (например, фиброза или рака), причем количество хорошо переносится (в пределах приемлемой токсичности или нежелательных явлений).

[452] Для целей настоящего изобретения типичная дозировка (на одно введение, такое как инъекция и инфузия) может лежать в диапазоне от любого значения от приблизительно 0,1 мг/кг до 1 мг/кг, до 2 мг/кг, до 3 мг/кг, до 5 мг/кг, до 10 мг/кг, до 20 мг/кг, до 30 мг/кг, до 100 мг/кг или более в зависимости от факторов, упомянутых выше. Согласно некоторым вариантам осуществления подходящие дозировки включают приблизительно 10-3000 мг на дозу, например приблизительно 10 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 120 мг, 150 мг, 180 мг, 200 мг, 240 мг, 300 мг, 400 мг, 500 мг, 800 мг, 1000 мг, 1600 мг, 2000 мг, 2400 мг и так далее. При повторных введениях 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 облегчения связанного с TGFβ1 показания или его симптома. Пример схемы применения содержит введение начальной дозы с последующим введением одной или нескольких поддерживающих доз. Однако можно применять и другие схемы применения в зависимости от профиля фармакокинетического распада, которого хочет достичь практикующий врач. Фармакокинетические эксперименты для оценки концентрации раскрытого в настоящем документе антитела в сыворотке могут быть легко проведены. Эта стабильность после введения может быть полезной, поскольку антитело можно вводить реже, сохраняя при этом клинически эффективную концентрацию в сыворотке у субъекта, которому вводят антитело (например, субъекта-человека). Согласно некоторым вариантам осуществления частота дозирования составляет один раз в 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. Ход этой терапии легко

контролировать с помощью обычных методов и анализов. Схему применения (включая используемое антитело) можно менять с течением времени.

[453] Согласно некоторым вариантам осуществления взрослому пациенту с нормальным весом можно вводить дозы в диапазоне от приблизительно 0,3 до 5,00 мг/кг. Конкретная схема применения, например, доза, интервалы и повторение, будет зависеть от конкретного индивидуума и истории болезни этого индивидуума, а также от свойств отдельных средств (таких как период полужизни средства и другие соответствующие соображения).

[454] Для целей настоящего изобретения подходящая дозировка раскрытого в настоящем документе антитела будет зависеть от используемого специфического антитела (или его композиций), от типа и тяжести показания, от того, вводят ли антитело в профилактических или терапевтических целях, от предшествующей терапии, от истории болезни пациента и ответа на антагонист и от усмотрения лечащего врача. Согласно некоторым вариантам осуществления врач будет вводить антитело до тех пор, пока не будет достигнута дозировка, обеспечивающая желаемый результат. Введение антитела может быть непрерывным или дробным в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, от того, является ли цель введения терапевтической или профилактической, и от других факторов, известных специалистам в данной области техники. Введение антитела может быть по существу непрерывным в течение предварительно выбранного периода времени или может осуществляться сериями разделенных интервалами доз, например, до, во время или после развития связанного с TGFβ1 показания.

[455] Концентрации антитела к TGFβ1 в сыворотке, которые терапевтически эффективны для лечения связанного с TGFβ1 показания, согласно настоящему изобретению могут составлять по меньшей мере приблизительно 10 мкг/мл, например от приблизительно 10 мкг/мл до 1,0 мг/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективные количества антитела, измеренные с помощью концентрации в сыворотке, составляет приблизительно 20-400 мкг/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективные количества антитела, измеренные с помощью концентраций в сыворотке, составляют приблизительно 100-800 мкг/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективные количества антитела, измеренные с помощью концентраций в сыворотке, составляют по меньшей мере приблизительно 20 мкг/мл, например по меньшей мере приблизительно 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 150 мкг/мл или 200 мкг/мл.

[456] В некоторых случаях рассматривается дробная схема применения. Дробная схема применения может быть особенно уместной, когда пациенты получают терапию, содержащую ингибитор TGFβ, которые не селективен в отношении TGFβ1, из-за более

высокого риска токсичности. Для снижения такого риска или управления им неселективный ингибитор TGFβ можно вводить нечасто или дробно, например «по мере необходимости».

[457] Исходя из наблюдения, что ингибирование TGFβ3 может увеличивать депонирование или накопление коллагена при фиброзе, можно рассмотривать возможность дополнительной терапии, включающей TGFβ1-селективный ингибитор (такой как новые антитела, раскрытые в настоящем документе) для пациентов, получающих ингибитор TGFβ с TGFβ3-ингибирующим действием, например ингибиторы TGFβ1/2/3, TGFβ1/3 и TGFβ3. Примеры ингибиторов TGFβ с TGFβ3-ингибирующим действием включают без ограничения низкомолекулярные антагонисты рецепторов TGFβ, например антагонисты ALK5, такие как галунисертиб (моногидрат LY2157299); моноклональные антитела (такие как нейтрализующие антитела), которые ингибируют все три изоформы («пан-ингибиторные» антитела) (смотри, например, WO 2018/134681); моноклональные антитела, которые предпочтительно ингибируют две из трех изоформ (например, TGFβ1/3) (например WO 2006/116002); и сконструированные молекулы (например, слитые белки), такие как ловушки лигандов (например, WO 2018/029367; WO 2018/129331 и WO 2018/158727). Согласно некоторым вариантам осуществления ловушка лигандов содержит структуру в соответствии с раскрытием WO/2018/15872. Согласно некоторым вариантам осуществления ловушка лигандов содержит структуру в соответствии с раскрытием WO 2018/029367; WO 2018/129331. Согласно некоторым вариантам осуществления ловушка лигандов представляет собой конструкцию, известную как M7824. Согласно некоторым вариантам осуществления ловушка лигандов представляет собой конструкцию, известную как AVID200. Согласно некоторым вариантам осуществления нейтрализующее антитело к пан-TGFβ представляет собой GC1008 или его производное. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело содержит последовательность в соответствии с раскрытием WO/2018/134681.

[458] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой нейтрализующее антитело, которое специфически связывает как TGFβ1, так и TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело предпочтительно связывает TGFβ1, а не TGFβ3. Например, антитело содержит последовательность в соответствии с раскрытием WO/2006/116002. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой 21D1.

[459] Дополнительная терапия направлена на противодействие или преодоление профибротического эффекта ингибирования TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления у пациента есть фиброзное нарушение или риск развития фиброзного

нарушения и/или сердечно-сосудистого заболевания. Например, пациент может страдать от метаболического состояния, которое связано с повышенным риском развития фиброза печени. Метаболические состояния, связанные с таким риском, включают ожирение, диабет типа 2 и NASH. Соответственно, настоящее изобретение включает TGFβ1-селективный ингибитор для применения в дополнительной терапии субъекта, получающего ингибитор TGFβ3, в количестве, достаточном для снижения профибротических эффектов ингибитора TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта есть фиброз. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта есть миелофиброз. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта есть распространенный рак, например метастатическая или местнораспространенная опухоль. Согласно некоторым вариантам осуществления TGFβ1-селективный ингибитор представляет собой Ab2, Ab46, Ab42, Ab50 или их производное. Согласно предпочтительным вариантам осуществления TGFβ1-селективный ингибитор представляет собой Ab46.

[460] Без ограничения теорией, согласно некоторым вариантам осуществления исключение ингибиторов TGFβ с анти-TGFβ3 активностью может быть особенно полезно для лечения пациентов, у которых диагностирован тип рака, о котором известно, что он является высокометастатическим, миелофиброзным, и/или у которых есть фиброзное состояние и/или сердечно-сосудистое заболевание или есть риск их развития. Соответственно, раскрытие в настоящем документе включает ингибитор TGFβ для применения в лечении рака, причем данный ингибитор не ингибирует TGFβ3, и причем у пациента есть метастатический рак или миелофиброз или у пациента есть фиброзное состояние и/или сердечно-сосудистое заболевание или есть риск их развития, причем, необязательно, фиброзное состояние представляет собой неалкогольный стеатогепатит (NASH).

[461] При использовании в настоящем документе термин «лечение» относится к применению или введению композиции, включающей один или несколько активных средств, субъекту, у которого есть связанное с TGFβ1 показание, симптом такого показания или предрасположенность к такому показанию, с целью вылечить, исцелить, смягчить, облегчить, изменить, исправить, нормализовать, улучшить или повлиять на показание, симптом показания или предрасположенность к показанию.

[462] Облегчение связанного с TGFβ1 показания с помощью раскрытого в настоящем документе антитела включает задержку развития или прогрессирования показания или уменьшение тяжести показания. Облегчение показания не обязательно требует лечебных результатов. При использовании в настоящем документе «задержка» развития показания, связанного со связанным с TGFβ1 показанием, означает отсрочку,

торможение, замедление, отставание, стабилизацию и/или отдаление прогрессирования показания. Эта задержка может иметь различную продолжительность, в зависимости от истории показания и/или индивидуумов, подвергаемых лечению. Способ, который «задерживает» или смягчает развитие показания или задерживает появление показания, представляет собой способ, который снижает вероятность развития одного или нескольких симптомов показания в заданный период времени и/или уменьшает выраженность симптомов в заданный период времени по сравнению с неиспользованием способа. Такие сравнения обычно основаны на клинических исследованиях с использованием количества субъектов, достаточного для получения статистически значимого результата.

Комбинированная терапия

[463] Настоящее изобретение также охватывает фармацевтические композиции и соответствующие способы, используемые в качестве комбинированной терапии для лечения субъектов, которым может принести пользу ингибирование TGFβ *in vivo*. Согласно любому из этих вариантов осуществления такие субъекты могут получать комбинированную терапию, которая включает первую композицию, содержащую по меньшей мере один ингибитор TGFβ, например антитело или его антигенсвязывающую часть, описанные в настоящем документе, в сочетании со второй композицией, содержащей по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, предназначенное для лечения того же самого или частично совпадающего заболевания или клинического состояния. Первая и вторая композиции могут вместе воздействовать на одну и ту же клеточную мишень или на разные клеточные мишени. Согласно некоторым вариантам осуществления первая и вторая композиции могут лечить или облегчать один и тот же или частично совпадающий набор симптомов или аспектов заболевания или клинического состояния. Согласно некоторым вариантам осуществления первая и вторая композиции могут лечить или облегчать разные наборы симптомов или аспектов заболевания или клинического состояния. Если привести только один пример, первая композиция может лечить заболевание или состояние, связанное с TGFβ-сигнализацией, тогда как вторая композиция может лечить воспаление или фиброз, связанный с тем же заболеванием, и так далее. Такие комбинированные терапии можно вводить в сочетании друг с другом. Фраза «в сочетании с» в контексте комбинированной терапии означает, что у субъекта, получающего комбинированную терапию, терапевтические эффекты первой терапии частично совпадают во времени и/или в пространстве с терапевтическими эффектами второй терапии. Таким образом, комбинированная терапия может быть приготовлена в виде одного состава для одновременного введения или в виде отдельных составов для последовательного введения терапевтических средств.

[464] Согласно предпочтительным вариантам осуществления комбинированная терапия оказывает синергетические эффекты при лечении заболевания. Термин «синергический» относится к эффектам, которые превышают аддитивные эффекты (например, выше эффективность) каждой монотерапии в совокупности.

[465] Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированная терапия, включающая фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, обеспечивает эффективность, которая в целом эквивалентна эффективности другой терапии (такой как монотерапия вторым средством), но связана с меньшим количеством нежелательных явлений или менее тяжелой токсичностью, связанной со вторым средством, по сравнению с монотерапией вторым средством. Согласно некоторым вариантам осуществления такая комбинированная терапия допускает более низкую дозировку второго средства, но сохраняет общую эффективность. Такая комбинированная терапия может быть особенно подходящей для популяций пациентов, в которых обосновано применение длительного лечения и/или которые включают педиатрических пациентов.

[466] Соответственно, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям и способам применения в комбинированной терапии для снижения активации белка TGFβ1 и лечения или предупреждения заболеваний или состояний, связанных с TGFβ1-сигнализацией, как описано в настоящем документе. Соответственно, данные способы или фармацевтические композиции дополнительно содержат вторую терапию. Согласно некоторым вариантам осуществления вторая терапия может быть полезна для лечения или предупреждения заболеваний или состояний, связанных с TGFβ1-сигнализацией. Вторая терапия может уменьшать или лечить по меньшей мере один симптом, связанный с целевым заболеванием. Первая и вторая терапии могут оказывать свои биологические эффекты за счет сходных или несвязанных механизмов действия; или одна или обе из первой и второй терапии могут оказывать свое биологическое действие за счет нескольких механизмов действия.

[467] Следует понимать, что фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут заключать первое и второе терапевтическое средство в одном и том же фармацевтически приемлемом носителе или в различных фармацевтически приемлемых носителях для каждого описанного варианта осуществления. Следует также понимать, что первую и вторую терапии можно вводить одновременно или последовательно в рамках описанных вариантов осуществления.

[468] Одно или несколько анти-TGFβ антител или их антигенсвязывающих частей согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами. Примеры дополнительных

терапевтических средств, которые можно применять с анти-TGFβ антителом согласно настоящему изобретению включают, но без ограничения, вакцины против рака, терапии сконструированными иммунными клетками, химиотерапии, лучевые терапии, модулятор члена суперсемейства TGFβ, такой как ингибитор миостатина и ингибитор GDF11; агонист VEGF; агонист IGF1; агонист FXR; ингибитор CCR2; ингибитор CCR5; двойной ингибитор CCR2/CCR5; ингибитор лизилоксидазоподобного белка-2; ингибитор ASK1; ингибитор ацетил-КоА-карбоксилазы (ACC); ингибитор киназы p38; пирфенидон; нинтеданиб; ингибитор M-CSF (например, антагонист рецептора M-CSF и нейтрализующие M-CSF средства); ингибитор MAPK (например, ингибитор Erk), агонист или антагонист иммунных контрольных точек; антагонист IL-11; и антагонист IL-6 и аналогичные средства. Другие примеры дополнительных терапевтических средств, которые можно применять с ингибиторами TGFβ, включают без ограничения ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), ингибитор тирозинкиназы, ингибитор киназы Ser/Thr, ингибитор киназы с двойной специфичностью. Согласно некоторым вариантам осуществления такое средство может представлять собой ингибитор PI3K, ингибитор PKC или ингибитор JAK. Согласно некоторым вариантам осуществления такое средство может представлять собой TGFβ3-селективный ингибитор. Согласно предпочтительным вариантам осуществления изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1 представляет собой Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

[469] Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор контрольных точек. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство выбирают из группы, состоящей из антагониста PD-1, антагониста PD-L1, белка слияния PD-L1 или PD-L2, антагониста CTLA4, агониста GITR, анти-ICOS антитела, анти-ICOSL антитела, анти-B7H3 антитела, анти-B7H4 антитела, анти-TIM3 антитела, анти-LAG3 антитела, анти-OX40 антитела, анти-CD27 антитела, анти-CD70 антитела, анти-CD47 антитела, анти-41BB антитела, анти-PD-1 антитела, онколитического вируса и ингибитора PARP. Согласно некоторым вариантам осуществления изоформно-специфичный ингибитор активации TGFβ1, раскрытый в настоящем документе, применяют в лечении рака у субъекта, который плохо отвечает или не отвечает на терапию ингибированием контрольных точек, такую как перечисленные в настоящем документе.

[470] Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство связывает костимулирующую молекулу Т-клеток, такую как ингибирующие костимулирующие молекулы и активирующие костимулирующие молекулы. Согласно

некоторым вариантам осуществления дополнительное средство выбирают из группы, состоящей из анти-CD40 антитела, анти-CD38 антитела, анти-KIR антитела, анти-CD33 антитела, анти-CD137 антитела и анти-CD74 антитела.

[471] 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 рекрутирования моноцитов/макрофагов и/или инфильтрацию ими тканей. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор активации звездчатых клеток печени. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство представляет собой антагонист хемокинового рецептора, такой как антагонисты CCR2 и антагонисты CCR5. Согласно некоторым вариантам осуществления такой антагонист хемокинового рецептора представляет собой антагонист с двойной специфичностью, такой как антагонист CCR2/CCR5. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство для введения в качестве комбинированной терапии представляет собой или содержит член суперсемейства TGFβ 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 представляет собой ингибитор сигнализации GDF8/миостатина. Согласно некоторым вариантам осуществления такое средство представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывает комплекс промиостатина/латентного миостатина и блокирует активацию миостатина. Согласно некоторым вариантам осуществления моноклональное антитело, которое специфически связывает комплекс промиостатина/латентного миостатина и блокирует активацию миостатина, не связывает свободный зрелый миостатин.

[472] Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительная терапия содержит клеточную терапию, такую как терапия CAR-T или терапия CAR-NK.

[473] Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительная терапия представляет собой вакцину от рака. Многочисленные клинические испытания противораковых вакцин на основе пептидов нацелены на гематологические злокачественные образования (раки крови), меланому (рак кожи), рак молочной железы,

рак головы и шеи, гастроэзофагеальный рак, рак легкого, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, и колоректальные раки. Антигены включают пептиды из HER2, теломеразы (TERT), сурвивина (BIRC5) и опухоли Вильмса 1 (WT1). В нескольких исследованиях также использовали «персонализированные» смеси из 12-15 отдельных пептидов. То есть они содержат смесь пептидов из опухоли пациента, против которых у пациента проявляется иммунный ответ. Некоторые исследования нацелены на солидные опухоли, глиому, глиобластому, меланому и рак молочной железы, шейки матки, яичников, колоректальный рак и немелкоклеточные раки легкого и включают антигены из MUC1, IDO1 (индоламин-2,3-диоксигеназы), CTAG1B и двух рецепторов VEGF, FLT1 и KDR. Стоит отметить, что вакцину к IDO1 тестировали на пациентах с меланомой в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек ипилимумабом и ингибитором BRAF (гена) вемурафенибом.

[474] Неограничивающие примеры опухолевых антигенов, применимых в качестве вакцин против рака, включают NY-ESO-1, HER2, HPV16 E7 (Papillomaviridae#E7), CEA (карциноэмбриональный антиген), WT1, MART-1, gp100, тирозиназу, URLC10, VEGFR1, VEGFR2, сурвивин, MUC1 и MUC2.

[475] Активированные иммунные клетки, примированные такой противораковой вакциной, могут, однако, быть частично исключены из TME с помощью TGFβ1-зависимых механизмов. Для преодоления иммуносупрессии, чтобы раскрыть потенциал вакцины, можно рассмотреть применение изоформно-специфичных ингибиторов TGFβ1, описанных в настоящем документе.

[476] Комбинированная терапия, рассматриваемая в настоящем документе, может с успехом использовать более низкие дозы вводимых терапевтических средств, что позволяет избежать возможной токсичности или осложнений, связанных с различными монотерапиями. Согласно некоторым вариантам осуществления применение изоформно-специфичного ингибитора TGFβ1, описанного в настоящем документе, может делать более восприимчивыми тех, кто плохо реагирует или не реагирует на терапию (например, стандартную). Согласно некоторым вариантам осуществления применение изоформно-специфичного ингибитора TGFβ1, описанного в настоящем документе, может позволять снижать дозу терапии (например, стандартнй) при сохранении эквивалентной клинической эффективности у пациентов, но при снижении или уменьшении степени связанных с лекарственным средством токсичности или нежелательных явлений.

[477] Согласно некоторым вариантам осуществления изоформно-селективные ингибиторы TGFβ1, рассматриваемые в настоящем документе, можно применять в сочетании (например, в виде комбинированной терапии, дополнительной терапии и так

далее) с ингибитором TGFβ3. Такое применение может дополнительно включать дополнительную терапию, такую как терапия, предназначенная для лечения фиброза, терапия рака, например ингибитор иммунных контрольных точек, вакцина от рака, лучевая терапия и/или химиотерапия.

[478] Согласно некоторым вариантам осуществления изоформно-селективные ингибиторы TGFβ1, рассматриваемые в настоящем документе, можно применять в сочетании (например, в виде комбинированной терапии, дополнительной терапии и так далее) с селективным ингибитором миостатина (GDF8).

[479] Согласно любому из вариантов осуществления, рассматриваемых в настоящем документе, для комбинированной терапии можно применять антитела, раскрытые в настоящем документе, например Ab37, Ab38, Ab39, Ab40, Ab41, Ab42, Ab43, Ab44, Ab45, Ab46, Ab47, Ab48, Ab49, Ab50, Ab51 и Ab52. Согласно некоторым вариантам осуществления предпочтительный ингибитор TGFβ1 представляет собой Ab2, Ab42, Ab46, Ab50, их производное или сконструированную молекулу, содержащую их антигенсвязывающий фрагмент.

Диагностика, отбор пациентов, мониторинг

[480] Терапевтические способы, которые включают терапию ингибированием TGFβ1, могут содержать диагностику связанного с TGFβ1 показания и/или отбор пациентов, которые, вероятно, ответят на такую терапию. Кроме того, у пациентов, получающих ингибитор TGFβ1, можно наблюдать за терапевтическими эффектами лечения, что обычно включает измерение одного или нескольких подходящих параметров, которые указывают на состояние и которые могут быть измерены (например, в анализе) до и после лечения, и оценку связанных с лечением изменений параметров. Например, такие параметры могут включать уровни биомаркеров, присутствующих в биологических образцах, взятых у пациентов. Биомаркеры могут быть на основе РНК, на основе белков, на основе клеток и/или на основе тканей. Например, гены, которые сверхэкспрессируются при определенных болезненных состояниях, могут служить биомаркерами для диагностики и/или мониторинга заболевания или ответа на терапию. Биомаркерами могут служить белки клеточной поверхности ассоциированных с заболеванием клеточных популяций. Такие способы могут включать прямые измерения параметров заболевания, свидетельствующих о распространенности конкретного заболевания, таких как размер/объем опухоли. Можно применять любые подходящие способы получения образцов, такие как взятие образцов сыворотки/крови, биопсия и визуализация. Биопсия может включать биопсию ткани (такой как опухоль) и жидкостную биопсию. Согласно некоторым вариантам осуществления жидкостная биопсия включает измерение или

обнаружение иммунных клеток в крови (например, в образце сыворотки и/или плазмы), например циркулирующих лимфоцитов, таких как циркулирующие MDSC. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни циркулирующих MDSC служат прогностическим биомаркером.

[481] Уровни циркулирующих MDSC можно определять в образце, таком как образец цельной крови или компонент крови (например, плазма или сыворотка). Согласно некоторым вариантам осуществления образец представляет собой свежую цельную кровь или компонент крови образца, который ранее не был заморожен. Согласно конкретным вариантам осуществления циркулирующие MDSC можно собирать путем забора периферической крови в пробирки с гепарином. Из периферической крови мононуклеарные клетки периферической крови могут быть выделены с использованием, например, способов элютриации, разделения на магнитных частицах или центрифугирования в градиенте плотности (например, Ficoll-Paque®), известных в данной области техники. Согласно некоторым вариантам осуществления MDSC можно отделять от мононуклеарных клеток периферической крови путем отбора по маркеру CD11b+ (например, с использованием CD11b+ микрогранул или антител). G-MDSC и M-MDSC можно дополнительно отличить от CD11b+ клеток с помощью, например, проточной цитометрии/анализа FACS на основе экспрессии поверхностных маркеров. Например, человеческие G-MDSC можно идентифицировать по экспрессии маркеров клеточной поверхности CD11b, CD33, CD15 и CD66b. Согласно некоторым вариантам осуществления человеческие G-MDSC также могут экспрессировать LOX-1, аргиназу и/или низкие уровни HLA-DR. Человеческие M-MDSC можно идентифицировать по экспрессии маркеров клеточной поверхности CD11b, CD33 и CD14, а согласно некоторым вариантам осуществления также по низким уровням HLA-DR. Количественное определение циркулирующих MDSC может быть представлено в процентах от общего количества CD45+ клеток.

[482] При том, что биопсии традиционно были стандартом диагностики и мониторинга различных заболеваний, таких как фиброз (например, фиброз органов) и пролиферативные нарушения (например, рак), инвазивные альтернативы могут быть предпочтительными. Например, многие неинвазивные методы визуализации *in vivo* можно применять для диагностики, мониторинга и отбора пациентов для лечения. Таким образом, настоящее изобретение относится к применению методов визуализации *in vivo* для диагностики и/или мониторинга заболевания у пациента или субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления пациент или субъект получает изоформно-специфичный ингибитор TGFβ1, описанный в настоящем документе. Согласно другим вариантам осуществления метод визуализации *in vivo* можно применять для отбора пациентов для

лечения изоформно-специфичным ингибитором TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие методы можно применять для определения того, реагируют ли пациенты на терапию, например терапию ингибированием TGFβ1, и как именно.

[483] Примеры методов визуализации *in vivo*, используемых для данных способов, включают, но без ограничения, рентгенографию, магнитно-резонансную томографию (МРТ), медицинскую ультрасонографию или ультразвук, эндоскопию, эластографию, тактильную визуализацию, термографию, медицинскую фотографию. Другие методы визуализации включают функциональную визуализацию в ядерной медицине, например позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ) и однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (ОФЭКТ). Способы проведения этих исследований и анализа результатов известны в данной области техники.

[484] Неинвазивные методы визуализации, обычно используемые для диагностики и мониторинга рака, включают, но без ограничения, магнитно-резонансную томографию (МРТ), компьютерную томографию (КТ), ультразвук, позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (ОФЭКТ), флуоресцентную отражательную визуализацию (FRI) и флуоресцентно-опосредованную томографию (FMT). Гибридные платформы визуализации также можно использовать для диагностики и мониторинга рака. Например, гибридные методы включают, но без ограничения, ПЭТ-КТ, FMT-CT, FMT-MRI и ПЭТ-МРТ. МРТ с динамическим контрастным усилением (DCE-MRI) является еще одним методом визуализации, обычно используемым для выявления рака молочной железы. Способы проведения этих методов и анализа результатов известны в данной области техники.

[485] Неинвазивные методы визуализации, обычно используемые для диагностики и мониторинга фиброза, включают, но без ограничения, ультразвук (например, обычное или с контрастным усилением ультразвуковое исследование), ультразвуковую эластографию (например, транзиентную эластографию, точечную сдвиговолновую эластографию и 2D-сдвиговолновую эластографию), КТ-сканирование (например, обычную КТ или визуализацию КТ-перфузии), магнитно-резонансную томографию (МРТ) (например, обычную МРТ, магнитно-резонансную эластографию, диффузионно-взвешенную магнитно-резонансную томографию, динатриевую соль гадоксетовой кислоты и визуализацию магнитно-резонансной перфузии).

[486] Согласно некоторым вариантам осуществления неинвазивные методы визуализации используют для оценки уровней фиброза печени или стеатоза печени. Например, методы визуализации, особенно полезные для оценки фиброза печени, могут включать, но без ограничения, FibroScan (транзиентную эластографию; TE), точечную

сдвиговолновую эластографию (pSWE; также известную как импульс силы акустического излучения (ARFI)), 2D-3D SWE, магнитно-резонансную эластографию (MRE) и мультипараметрическую МРТ. Методы визуализации, особенно полезные для оценки стеатоза печени, могут включать, но без ограничения, ультрасонографию, эластографию с контролируемым параметром затухания (CAP), измеренную с помощью МРТ протонную плотность жировой фракции (MRI-PDFF) и магнитно-резонансную спектроскопию (MRS). Согласно некоторым вариантам осуществления метод визуализации *in vivo* используют для оценки жесткости печени. Согласно некоторым вариантам осуществления метод визуализации *in vivo* используют для детектирования и оценки внутрипеченочных уровней триглицеридов. Согласно некоторым вариантам осуществления метод визуализации *in vivo* используют для оценки узловатости поверхности печени (LSN; также известной как «оценка печени»), жесткости печени и/или отношения объемов сегментов печени (LSVR), которые полезны для определения стадии фиброза печени и подстадии цирроза. Способы проведения этих методов и анализа результатов известны в данной области техники.

[487] В последнее время разрабатываются неинвазивные способы визуализации, которые позволят обнаруживать представляющие интерес клетки (например, цитотоксические Т-клетки, макрофаги и раковые клетки) *in vivo*. Смотри, например, документы www.imaginab.com/technology/; Tavare *et al.,* (2014) *PNAS*, 111(3): 1108-1113; Tavare *et al.,* (2015) *J Nucl Med* 56(8): 1258-1264; Rashidian *et al.,* (2017) *J Exp Med* 214(8): 2243-2255; Beckford Vera *et al.,* (2018) *PLoS один* 13(3): e0193832; и Tavare *et al.,* (2015) *Cancer Res* 76(1): 73-82, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки. Так называемое «отслеживание Т-клеток» направлено на обнаружение и локализацию противоопухолевых эффекторных Т-клеток *in vivo*. Оно может давать полезную информацию для понимания иммуносупрессивного фенотипа солидных опухолей. Опухоли, которые хорошо инфильтрированы цитотоксическими Т-клетками («воспаленные» или «горячие» опухоли), вероятно, реагируют на терапии рака, такие как терапия блокадой контрольных точек (CBT). С другой стороны, опухоли с иммуносупрессивными фенотипами обычно характеризуются слабой Т-клеточной инфильтрацией даже при наличии противоопухолевого иммунного ответа. Эти так называемые «исключающие иммунный ответ» опухоли, вероятно, не реагируют на терапии рака, такие как CBT. Метод отслеживания Т-клеток может выявлять такие различные фенотипы и предоставлять информацию для выбора терапевтического подхода, который, вероятно, принесет пользу пациентам. Например, пациенты с «исключающей иммунный ответ» опухолью, вероятно, получат пользу от терапии ингибиторами TGFβ1, способствующей обращению иммуносупрессивного фенотипа. Предполагают, что схожие

методы можно применять для диагностики и мониторинга других заболеваний, например фиброза. Обычно антитела или антителоподобные молекулы, сконструированные с детектирующим фрагментом (например, радиоактивной меткой, флуоресцентной меткой и так далее) можно вводить пациенту, и затем они распределяются и локализуются в участках определенного маркера (например в CD8+ и M2-макрофагах).

[488] Неинвазивные методы визуализации *in vivo* можно применять в различных подходящих способах для целей диагностики пациентов; отбора или идентификации пациентов, которые, вероятно, получат пользу от терапии ингибиторами TGFβ1; и/или мониторинга пациентов в отношении терапевтического ответа на лечение. Любые клетки с известным маркером клеточной поверхности могут быть обнаружены/локализованы благодаря использованию антитела или подобных молекул, которые специфически связываются с клеточным маркером. Как правило, клетки, выявляемые с помощью таких методов, представляют собой иммунные клетки, такие как цитотоксические Т-лимфоциты, регуляторные Т-клетки, MDSC, ассоциированные с заболеванием макрофаги (M2-макрофаги, такие как TAM и FAM), NK-клетки, дендритные клетки и нейтрофилы.

[489] Неограничивающие примеры подходящих маркеров иммунных клеток включают маркеры моноцитов, маркеры макрофагов (например, маркеры M1 и/или M2-макрофагов), маркеры CTL, маркеры супрессивных иммунных клеток, маркеры MDSC (например, маркеры G- и/или M-MDSC), включая без ограничения CD8, CD3, CD4, CD11b, CD163, CD206, CD68, CD14, CD15, CD66, CD34, CD25 и CD47.

[490] Методы визуализации *in vivo*, описанные выше, можно использовать для обнаружения, локализации и/или отслеживания определенных MDSC у пациента, у которого диагностировано TGFβ1-ассоциированное заболевание, такое как рак и фиброз. У здоровых индивидуумов MDSC в циркуляции отсутствуют или имеют низкую плотность. С началом или прогрессированием такого заболевания могут быть обнаружены повышенные уровни циркулирующих и/или ассоциированных с заболеванием MDSC. Например, сообщалось, что CCR2-положительные M-MDSC накапливаются в тканях с воспалением и могут вызывать прогрессирование фиброза в ткани (такого как легочный фиброз), и показано, что это коррелирует с экспрессией TGFβ1. Аналогично, MDSC распространены в ряде солидных опухолей (включая тройной негативный рак молочной железы) и частично способствуют иммуносупрессивному фенотипу TME. Поэтому ответ на терапию ингибированием TGFβ1 согласно настоящему изобретению можно отслеживать путем локализации, отслеживания или измерения MDSC. Уменьшение количества или низкая плотность детектируемых MDSC обычно свидетельствуют о терапевтической пользе или лучшем прогнозе.

[491] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения фиброза, прогнозирования или определения эффективности и/или подтверждения фармакологического ответа путем мониторинга уровней циркулирующих MDSC в образце, полученном от пациента (например, в крови (например, в сыворотке и/или плазме пациента)), получающего ингибитор TGFβ, например TGFβ1-селективный ингибитор (такой как селективный ингибитор proTGFβ1 или латентного TGFβ1, как описано в настоящем документе), изоформно-неселективные ингибиторы TGFβ (такие как низкомолекулярные антагонисты ALK5, нейтрализующие антитела, которые связывают два или более из TGFβ1/2/3, например GC1008 и варианты, антитела, которые связывают TGFβ1/3, ловушки лигандов, например ингибиторы TGFβ1/3) и/или ингибитор интегрина (и ингибиторы интегринов (например, антитела, которые связываются с интегринами αVβ3, αVβ5, αVβ6, αVβ8, α5β1, αIIbβ3 или α8β1 и ингибируют последующую активацию TGFβ, например, селективно ингибируют TGFβ1 и/или TGFβ3). Примеры ингибиторов интегринов включают антитела к интегрину αVβ8, предлагаемые в документе WO2020051333, раскрытие которого включено посредством ссылки. Согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в настоящем документе, циркулирующие MDSC можно измерять в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней или в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 недель (например, предпочтительно, менее 6 недель) после введения лечения субъекту, например введения терапевтической дозы ингибитора TGFβ.

[492] Известно, что многие виды рака человека вызывают повышение уровней MDSC у пациентов по сравнению со здоровым контролем (рассмотрено, например, в документе Elliott *et al.,* (2017) “Human tumor-infiltrating myeloid cells: phenotypic and functional diversity” *Frontiers in Immunology*, Vol. 8, Article 86). Эти виды рака человека включают, но без ограничения, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак молочной железы, глиобластому, гепатоклеточную карциному, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак легких, меланому, NSCL, рак яичников, рак поджелудочной железы и почечно-клеточную карциному. Повышенные уровни MDSC могут быть обнаружены в биологических образцах, таких как мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и образцы тканей (например, биопсия опухоли). Например, плотность или изменения количества MDSC можно измерять как долю в процентах (%) от общего числа PBMC, долю в процентах (%) от CD14+ клеток, долю в процентах (%) от CD45+ клеток; долю в процентах (%) от мононуклеарных клеток, долю в процентах (%) от общего числа клеток, долю в процентах (%) от CD11b+ клеток, долю в процентах (%) от моноцитов, долю в процентах (%) от нелимфоцитарных MNC, долю в процентах (%) от KLA-DR клеток с помощью подходящих маркеров клеточной поверхности (фенотипа).

[493] Кроме того, с помощью маркеров иммунных клеток в случае рака можно определять, характеризуется ли опухоль исключающим иммунный ответ фенотипом. Если определено, что опухоль характеризуется исключающим иммунный ответ фенотипом, терапия рака (такая как СВТ) в отдельности может быть неэффективной, поскольку у опухоли отсутствует достаточное количество цитотоксических клеток в опухолевом окружении. Поэтому дополнительная терапия ингибитором TGFβ1, таким как описанные в настоящем документе, может снижать иммуносупрессию, тем самым делая резистентную к терапии рака опухоль более восприимчивой к терапии рака. Предполагается, что иммунные маркеры можно также использовать для отслеживания иммунных клеток в контексте фиброза и/или определения состава иммунных клеток в фиброзной ткани (например, для отслеживания присутствия макрофагов и/или миофибробластов).

[494] Соответственно, настоящее изобретение также относится к способу лечения связанного с TGFβ1 заболевания или состояния, который может предусматривать следующие стадии: i) отбор пациента, у которого диагностировано связанное с TGFβ1 заболевание или состояние; и ii) введение пациенту антитела или фрагмента, описанных в настоящем документе, в количестве, эффективном для лечения данных заболевания или состояния. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия отбора (i) содержит детектирование маркеров заболевания (например, маркеров фиброза или рака, как описано в настоящем документе), причем, необязательно, детектирование содержит анализ биопсии, анализ сывороточных маркеров и/или визуализацию *in vivo*. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия отбора (i) содержит метод визуализации *in vivo*, как описано в настоящем документе.

[495] Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с TGFβ1 заболевание или состояние представляет собой фиброзное состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия отбора (i) содержит детектирование клеток миофибробластов или одного или нескольких их маркеров. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия отбора (i) содержит детектирование стеатоза печени, триглицеридов в печени, иммунных клеток и/или миофибробластов. Согласно некоторым вариантам осуществления детектирование содержит анализ биопсии, анализ сывороточных маркеров и/или визуализацию *in vivo*. Согласно некоторым вариантам осуществления визуализация *in vivo* содержит ультразвук, ультразвуковую эластографию, КТ-сканирование, МРТ, ПЭТ-ОФЭКТ, оптическую флуоресценцию/биолюминесценцию, FibroScan (TE), pSWE, 2D-3D SWE, MRE, ультрасонографию, CAP, MRI-PDFF и/или MRS. Согласно некоторым вариантам осуществления визуализация *in vivo* содержит прямое или непрямое мечение иммунных клеток или антитела, которое связывает маркер клеточной поверхности

иммунных клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления визуализация *in vivo* содержит использование индикатора.

[496] Согласно некоторым вариантам осуществления метод визуализации *in vivo* измеряет стеатоз печени, триглицериды в печени, иммунные клетки (например, как описано ниже) и/или миофибробласты. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение уменьшает уровень триглицеридов, стеатоз, узлы на поверхности печени, воспаление и/или количество макрофагов в пораженной ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления внутрипеченочное содержание триглицеридов у выбранного пациента составляет >5,5% от объема печени, причем, необязательно, внутрипеченочное содержание триглицеридов составляет >10% от объема печени. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение снижает внутрипеченочное содержание триглицеридов до ≤5,5% от объема печени. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение снижает уровень MDSC в пораженной ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение уменьшает количество макрофагов в пораженной ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество составляет от 0,1 мг/кг до 30 мг/кг, необязательно от 3 мг/кг до 30 мг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает мониторинг субъекта в отношении терапевтического ответа, описанного в настоящем документе (например, снижения уровня триглицеридов, уменьшения стеатоза, уменьшение узлов на поверхности печени, уменьшения воспаления, уменьшения количества макрофагов и/или уменьшения оцеки печени).

[497] Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака, который может предусматривать следующие стадии: i) отбор пациента, у которого диагностирован рак, включающий солидную опухоль, причем солидная опухоль является или предположительно является исключающей иммунный ответ опухолью; и ii) введение пациенту антитела или фрагмента, описанного в настоящем документе, в количестве, эффективном для лечения рака. Предпочтительно, пациент получил или является кандидатом на получение терапии рака, такой как терапия ингибированием иммунных контрольных точек (например, PD-(L)1 антителами), химиотерапия, лучевая терапия, терапия сконструированными иммунными клетками и терапия вакцинами от рака. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия отбора (i) содержит детектирование иммунных клеток или одного или нескольких их маркеров, причем, необязательно, детектирование содержит анализ биопсии опухоли, анализ сывороточных маркеров и/или визуализацию *in vivo*. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия отбора (i) содержит метод визуализации *in vivo*, описанный в настоящем документе. Согласно

некоторым вариантам осуществления способ дополнительно содержит мониторинг в отношении терапевтического ответа, как описано в настоящем документе.

[498] Согласно некоторым вариантам осуществления визуализацию *in vivo* выполняют для мониторинга терапевтического ответа на терапию ингибированием TGFβ1 у субъекта. Визуализация *in vivo* может включать любой из методов визуализации, описанных в настоящем документе, и измерять любой из маркеров и/или параметров, описанных в настоящем документе. Например, в случае фиброза печени терапевтический ответ может включать уменьшение стеатоза печени, уменьшение содержания триглицеридов, уменьшение депонирования/фиброза в ECM, уменьшение цирроза и/или замедление прогрессирования заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение изоформно-специфичным ингибитором TGFβ1, описанным в настоящем документе, уменьшает внутрипеченочное содержание триглицеридов до уровней ≤ 5,5% при измерении с помощью МРТ. В случае рака терапевтический ответ может включать преобразование исключающей иммунный ответ опухоли в воспаленную опухоль (что коррелирует с повышенной инфильтрацией иммунных клеток в опухоль), уменьшение размера опухоли и/или замедление прогрессирования заболевания. Повышенная инфильтрация иммунных клеток может быть визуализирована по повышению плотности внутриопухолевых иммунных клеток или величины сигналов детектирования, такого как радиоактивное мечение и флуоресценция.

[499] Согласно некоторым вариантам осуществления визуализация *in vivo*, используемая для диагностики, отбора, лечения или мониторинга пациентов, включает отслеживание MDSC, таких как G-MDSC (также известных как PMN-MDSC) и M-MDSC. Например, очаг заболевания (такой как фиброзные ткани и солидные опухоли) может быть исходно обогащен MDSC. В результате терапии (например, терапии ингибиторами TGFβ1) можно наблюдать меньшее количество MDSC, измеренное по снижению интенсивности метки (такой как радиоизотопная и флуоресцентная), что указывает на терапевтические эффекты.

[500] Согласно некоторым вариантам осуществления визуализация *in vivo* включает отслеживание или локализацию LRRC33-положительных клеток. LRRC33-положительные клетки включают, например, MDSC и активированные M2-подобные макрофаги (например, TAM и активированные макрофаги, ассоциированные с фиброзными тканями). Например, очаг заболевания (такой как фиброзные ткани и солидные опухоли) может быть исходно обогащен LRRC33-положительными клетками. В результате терапии (например, терапии ингибиторами TGFβ1) можно наблюдать меньшее количество клеток, экспрессирующих

поверхностноклеточный LRRC33, измеренное по снижению интенсивности метки (такой как радиоизотопная и флуоресцентная), что указывает на терапевтические эффекты.

[501] Согласно некоторым вариантам осуществления методы визуализации *in vivo*, описанные в настоящем документе, могут включать применение ПЭТ-ОФЭКТ, МРТ и/или оптической флуоресценции/биолюминесценции для детектирования представляющих интерес клеток.

[502] Согласно некоторым вариантам осуществления мечение антител или антителоподобных молекул детектируемым фрагментом может включать прямое мечение или непрямое мечение.

[503] Согласно некоторым вариантам осуществления детектируемый фрагмент может представлять собой индикатор. Согласно некоторым вариантам осуществления индикатор может представлять собой радиоизотоп, причем, необязательно, радиоизотоп может представлять собой излучающий позитроны изотоп. Согласно некоторым вариантам осуществления радиоизотоп выбирают из группы, состоящей из ^{18}F, ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{68}Ga, ^{177}Lu и ^{89}Zr.

[504] Таким образом, такие способы могут быть использованы для проведения визуализации *in vivo* с использованием меченых антител в иммунной ПЭТ.

[505] Соответственно, настоящее изобретение также относится к способу лечения связанного с TGFβ1 показания у субъекта, который предусматривает стадию диагностики, отбора пациентов и/или мониторинга терапевтических эффектов, в котором используют метод визуализации. Согласно некоторым вариантам осуществления высокоаффинный изоформно-селективный ингибитор TGFβ1 согласно настоящему изобретению применяют в лечении связанного с TGFβ1 показания, причем лечение предусматривает введение эффективного количества ингибитора TGFβ1 для лечения показания и дополнительно предусматривает стадию мониторинга терапевтических эффектов у субъекта с помощью визуализации in vivo. Необязательно, субъект может быть выбран кандидатом на получение терапии ингибиторами TGFβ1 с помощью стадии диагностики или отбора, которая предусматривает визуализацию in vivo. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с TGFβ1 показание представляет собой пролиферативное нарушение (такое как рак с солидной опухолью и миелофиброз). Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с TGFβ1 показание представляет собой фиброзное нарушение (такое как фиброз органов).

Циркулирующий/циркуляторный латентный TGFβ

[506] Согласно настоящему изобретению циркулирующий латентный TGFβ может служить биомаркером взаимодействия с мишенью. Если ингибитор активации выбран в

качестве терапевтического кандидата, например, такой биомаркер можно использовать для оценки или подтверждения взаимодействия с мишенью *in vivo* путем мониторинга уровней циркулирующего латентного TGFβ до и после введения. Согласно различным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения связанного с TGFβ нарушения, предусматривающим мониторинг уровня циркулирующего латентного TGFβ (например, TGFβ1) в образце, полученном от пациента (например, в крови, например в плазме и/или сыворотке, пациента), получающего ингибитор TGFβ. Уровень циркулирующего латентного TGFβ можно отслеживать отдельно или в сочетании с одним или несколькими биомаркерами, раскрытыми в настоящем документе (например, MDSC). Согласно конкретным вариантам осуществления ингибитор TGFβ можно вводить отдельно или в сочетании с дополнительной терапией. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение можно вводить субъекту, страдающему от фиброзного нарушения (например, фиброза органов). Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ представляет собой TGFβ1-селективное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ представляет собой изоформно-неселективный ингибитор TGFβ (такой как низкомолекулярные антагонисты ALK5, нейтрализующие антитела, которые связывают два или более из TGFβ1/2/3, например GC1008 и варианты, антитела, которые связывают TGFβ1/3, и ловушки лигандов, например ингибиторы TGFβ1/3). Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ представляет собой ингибитор интегрина (например, антитело, которое связывается с интегринами αVβ3, αVβ5, αVβ6, αVβ8, α5β1, αIIbβ3 или α8β1 и ингибирует последующую активацию TGFβ, например селективно ингибирует TGFβ1 и/или TGFβ3).

[507] Согласно различным вариантам осуществления циркулирующий латентный TGFβ (например, латентный TGFβ1) можно измерять в образце, полученном от субъекта (например, в цельной крови или компоненте крови). Согласно различным вариантам осуществления уровни циркулирующего латентного TGFβ (например, латентного TGFβ1) можно измерять в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 21, 25, 28, 30, 35, 40, 45, 48, 50 или 56 дней после введения ингибитора TGFβ субъекту, например вплоть до 7 дней после введения терапевтической дозы ингибитора TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни циркулирующего латентного TGFβ (например, латентного TGFβ1) можно измерять любым способом, известным в данной области техники (например, ELISA).

[508] Согласно различным вариантам осуществления способ лечения фиброзного нарушения или другого связанного с TGF нарушения предусматривает введение

ингибитора TGFβ (например, антитела против TGFβ1, например изоформно-селективного ингибитора активации TGFβ1, такого как Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные) нуждающемуся в этом пациенту и подтверждение уровня взаимодействия ингибитора с мишенью. Согласно некоторым вариантам осуществления определение уровня взаимодействия с мишенью содержит определение уровней циркулирующего латентного TGFβ (например, TGFβ1) в образце, полученном от пациента (например, в крови или компоненте крови пациента), получающего ингибитор TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления повышение уровня циркулирующего латентного TGFβ (например, TGFβ1) после введения ингибитора TGF указывает на взаимодействие с мишенью. Согласно некоторым вариантам осуществления повышение уровня циркулирующего латентного TGFβ (например, TGFβ1) по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз или более после введения ингибитора TGF указывает на взаимодействие с мишенью. Согласно различным вариантам осуществления настоящее раскрытие также относится к способам использования уровней циркулирующего латентного TGFβ (например, уровней TGFβ1) в качестве прогностического биомаркера, то есть для предсказания терапевтического ответа, а также для информирования о дальнейших решениях о лечении (например, продолжении лечения, если наблюдается повышение уровня).

[509] Согласно одному аспекту настоящего раскрытия уровни циркулирующего латентного TGFβ определяют для информирования о лечении и прогнозирования терапевтической эффективности у субъектов, которым вводили ингибитор TGFβ, такой как TGFβ1-селективный ингибитор, описанный в настоящем документе (например, Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные). Согласно конкретным вариантам осуществления ингибитор TGFβ (например, изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1, такой как Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные) вводят по одному или вместе (например, одновременно), по отдельности или последовательно с дополнительной терапией, так что количество введенного ингибитора TGFβ1 является достаточным для повышения уровней циркулирующего латентного TGFβ (например, латентного TGFβ1) по сравнению с исходными уровнями циркулирующего латентного TGFβ. Уровни циркулирующего латентного TGFβ можно измерять до или после каждого лечения, так что повышение уровней циркулирующего латентного TGFβ (например, латентного TGFβ1) после лечения указывает на терапевтическую эффективность. Например, уровни циркулирующего латентного TGFβ (например, латентного TGFβ1) можно измерять до и после введения

ингибитора TGFβ, и повышение уровней циркулирующего латентного TGFβ (например, латентного TGFβ1) после лечения является прогнозом терапевтической эффективности. Согласно некоторым вариантам осуществления, при детектировании повышения лечение продолжают. Согласно конкретным вариантам осуществления уровни циркулирующего латентного TGFβ можно измерять до и после введения первой дозы ингибитора TGFβ, такого как ингибитор TGFβ1, описанный в настоящем документе (например, изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1, такой как Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные), и повышение уровней циркулирующего латентного TGFβ (например, латентного TGFβ1) после введения является прогнозом терапевтической эффективности и служит дополнительным основанием для введения второй или следующей дозы (доз) ингибитора TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни циркулирующего латентного TGFβ (например, латентного TGFβ1) можно измерять до и после комбинированного лечения ингибитором TGFβ, таким как TGFβ1-селективный ингибитор (например, изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1, такой как Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные), и дополнительной терапией, вводимой вместе (например, одновременно), по отдельности или последовательно, и изменение уровней циркулирующего латентного TGFβ после лечения является прогнозом терапевтической эффективности. Согласно некоторым вариантам осуществления при детектировании повышения лечение продолжают. Согласно некоторым вариантам осуществления повышение уровней циркулирующего латентного TGFβ после комбинированного лечения может обуславливать продолжение лечения.

[510] Согласно различным вариантам осуществления настоящее раскрытие охватывает способ лечения связанного с TGFβ нарушения, например фиброзного нарушения, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества ингибитора TGFβ (например, изоформно-селективного ингибитора активации TGFβ1, такого как Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные), субъекту со связанным с TGFβ нарушением, причем терапевтически эффективное количество представляет собой количество, достаточное для повышения уровня циркулирующего латентного TGFβ (например, латентного TGFβ1). Согласно конкретным вариантам осуществления ингибитор TGFβ представляет собой ингибитор активации TGFβ. Согласно конкретным вариантам осуществления ингибитор TGFβ представляет собой ингибитор TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ представляет собой изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1, такой как Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные. Согласно конкретным вариантам осуществления циркулирующий латентный TGFβ представляет собой латентный TGFβ1. Согласно некоторым вариантам

осуществления терапевтически эффективное количество ингибитора TGFβ (например, изоформно-селективного ингибитора активации TGFβ1, такого как Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные), составляет 0,1-30 мг/кг на дозу. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ вводят еженедельно, каждые 2 недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели, ежемесячно, каждые 6 недель, каждые 8 недель, раз в два месяца, каждые 10 недель, каждые 12 недель, каждые 3 месяца, каждые 4 месяца, каждые 6 месяцев, каждые 8 месяцев, каждые 10 месяцев или один раз в год.

[511] Согласно различным вариантам осуществления циркулирующий латентный TGFβ (например, латентный TGFβ1) можно измерять в образце, полученном от субъекта (например, в цельной крови или компоненте крови). Согласно некоторым вариантам осуществления циркулирующий латентный TGFβ1 можно измерять с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), в котором измеряют общий свободный TGFβ1 после обработки кислотой. Анализ латентного TGF-β1 посредством ELISA TGF-β1 сначала требует диссоциации TGF-β1 от латентного комплекса, например с помощью подкисления образцов. Затем ELISA измеряет общий TGF-β1, эквивалентный диссоциированному латентному TGF-β1, в дополнение к любому свободному TGF-β1, присутствующему до подкисления, о котором известно, что он составляет лишь небольшую часть циркулирующего TGFβ1. Согласно конкретным вариантам осуществления уровень циркулирующего латентного TGFβ (например, латентного TGFβ1) после введения ингибитора TGFβ возрастает по меньшей мере в два раза (например, по меньшей мере в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз и 10 раз) по сравнению с уровнями циркулирующего латентного TGFβ до введения.

[512] Согласно конкретным вариантам осуществления уровни циркулирующего общего TGFβ (например, латентного и зрелого TGFβ1) можно использовать для мониторинга взаимодействия с мишенью и фармакологической активности ингибитора TGFβ у субъекта, получающего терапию ингибитором TGFβ (например, изоформно-селективным ингибитором активации TGFβ1, таким как Ab2, Ab42, Ab46, Ab50 или их производные). Согласно конкретным вариантам осуществления уровни циркулирующего общего TGFβ (например, уровни латентного и зрелого TGFβ1) можно измерять до и после введения первой дозы ингибитора TGFβ, так что повышение уровней циркулирующего TGFβ по меньшей мере в два раза (например по меньшей мере в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более) после введения указывает на взаимодействие с мишенью (например, связывание ингибитора TGFβ с человеческим большим латентным комплексом proTGFb1). Согласно конкретным вариантам осуществления уровни циркулирующего латентного TGFβ (например, латентного TGFβ1) можно измерять до и

после введения первой дозы ингибитора TGFβ, так что повышение уровней циркулирующего латентного TGFβ (например, латентного TGFβ1) после введения указывает на терапевтическую эффективность. Согласно конкретным вариантам осуществления лечение продолжают, если детектируют повышение уровней циркулирующего латентного TGFβ (например, латентного TGFβ1) после введения ингибитора TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления общий TGFβ1 в образце крови (например, сыворотке) содержит как латентную, так и зрелую формы, первая из которых представляет подавляющее большинство циркуляторного TGFβ1. Обработка образца кислотой высвобождает зрелый фактор роста из латентного комплекса. Затем можно использовать хорошо известные анализы, такие как ELISA, для измерения количества свободного TGFβ1. В качестве альтернативы, реагенты, такие как антитела, которые специфически связывают латентную форму TGFβ1, можно использовать для точного измерения циркуляторного латентного TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни циркулирующего латентного TGFβ (например, латентного TGFβ1) можно измерять до и после введения первой дозы ингибитора TGFβ, и повышение уровней циркулирующего латентного TGFβ (например, латентного TGFβ1) после введения указывает на взаимодействие с мишенью и/или ответ на лечение и/или служит дополнительным основанием для введения второй или следующей дозы (доз) ингибитора TGFβ. Согласно другому варианту осуществления уровни циркулирующего латентного TGFβ можно измерять до и после введения первой дозы ингибитора TGFβ, такого как TGFβ1-селективный ингибитор, и повышение уровней циркулирующего латентного TGFβ после введения указывает на взаимодействие с мишенью и/или ответ на лечение и/или служит дополнительным основанием для продолжения лечения. Согласно различным вариантам осуществления ингибитор TGFβ, такой как TGFβ1-селективный ингибитор, изоформно-неселективный ингибитор (например, низкомолекулярные антагонисты ALK5), нейтрализующие антитела, которые связывают два или более из TGFβ1/2/3 (например, GC1008 и варианты), антитела, которые связывают TGFβ1/3, и/или ингибитор интегрина (например, антитело, которое связывается с интегринами αVβ3, αVβ5, αVβ6, αVβ8, α5β1, αIIbβ3 или α8β1 и ингибирует последующую активацию TGFβ, например селективно ингибирует TGFβ1 и/или TGFβ3).

[513] Согласно некоторым вариантам осуществления переработка крови в сыворотку активирует тромбоциты и приводит к высвобождению больших пулов латентного TGFβ1, что затрудняет измерения. Поэтому согласно некоторым вариантам осуществления предпочтительно измерять циркулирующие уровни TGFβ1 в плазме, а не в сыворотке. Соответственно, согласно предпочтительным вариантам осуществления

циркулирующий TGFβ (например, уровни циркулирующего латентного TGFβ (например, латентного TGFβ1)) измеряют в образцах плазмы, взятых у субъекта.

Различные модификации и варианты

[514] Ниже кратко рассмотрены неограничивающие варианты, модификации и признаки любых антител или их антигенсвязывающих фрагментов, охватываемых настоящим раскрытием. Также предусмотрены варианты осуществления соответствующих аналитических способов.

[515] Встречающиеся в природе структурные единицы антител обычно содержат тетрамер. Каждый такой тетрамер обычно состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара содержит одну полноразмерную «легкую» (согласно конкретным вариантам осуществления приблизительно 25 кДа) и одну полноразмерную «тяжелую» цепь (согласно конкретным вариантам осуществления приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи обычно включает вариабельный участок приблизительно из 100-110 или более аминокислот, который обычно отвечает за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи обычно определяет константный участок, который может отвечать за эффекторную функцию. Легкие цепи антител человека обычно классифицируют как легкие цепи каппа и лямбда. Тяжелые цепи обычно классифицируют как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, и они определяют изотип антитела. Антитело может быть любого типа (например, IgM, IgD, IgG, IgA, IgY и IgE) и класса (например, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgM_1, IgM_2, IgA_1 и IgA_2). В полноразмерных легких и тяжелых цепях вариабельные и константные участки обычно соединены участком «J» приблизительно из 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает участок «D» приблизительно из 10 более аминокислот (смотри, например, документ Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (включен посредством ссылки во всей полноте)). Вариабельные участки каждой пары легкая/тяжелая цепь обычно образуют антигенсвязывающий сайт.

[516] Согласно некоторым вариантам осуществления «идентичность в процентах» двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, в модификации 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 белков BLAST можно проводить с помощью программы XBLAST, вес=50, длина слова=3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных представляющим интерес белковым молекулам. Если между двумя последовательностями есть гэпы, можно использовать Gapped BLAST, как описано в документе Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*

25(17):3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры соответствующих программ по умолчанию (например, XBLAST и NBLAST).

[517] В любом из антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, в CDR или в каркасные последовательности в положениях, где остатки, вероятно, не будут участвовать во взаимодействии антитело-антиген, могут быть введены одна или несколько консервативных мутаций. Согласно некоторым вариантам осуществления такая консервативная мутация(и) может быть введена в CDR или каркасные последовательности в положении(ях), в котором остатки, вероятно, не будут участвовать во взаимодействии с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и комплексом LRRC33-TGFβ1, как определено на основе кристаллической структуры. Согласно некоторым вариантам осуществления вероятная область контакта (например, остатки, участвующие во взаимодействии антиген-антитело) может быть получена из известной структурной информации о другом антигене, имеющем структурное сходство.

[518] При использовании в настоящем документе «консервативная аминокислотная замена» относится к аминокислотной замене, которая не изменяет характеристики относительного заряда или размера белка, в котором произведена аминокислотная замена. Варианты могут быть получены в соответствии со способами изменения полипептидной последовательности, известными рядовому специалисту в данной области техники, такими как доступные в материалах, в которых такие способы собраны, 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 замены, сделанные среди аминокислот в пределах следующих групп: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; и (г) E, D.

[519] Вариабельные участки обычно демонстрируют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных участков (FR), соединенных тремя гипервариабельными участками, также называемыми определяющими комплементарность участками или CDR. CDR из двух цепей каждой пары обычно выровнены по каркасным участкам, что может обеспечивать связывание со специфичным эпитопом. От N-конца к C-концу вариабельные участки как легкой, так и тяжелой цепи обычно содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Отнесение аминокислот к каждому домену обычно соответствует определениям последовательностей белков, представляющих иммунологический интерес, по Кабату (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 и

1991)) или Chothia & Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Chothia *et al.,* (1989) *Nature* 342: 878-883. CDR легкой цепи также могут обозначаться как L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, а CDR тяжелой цепи также могут обозначаться как H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело может содержать небольшое количество аминокислотных делеций с карбокси-конца тяжелой цепи(ей). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит тяжелую цепь с 1-5 аминокислотными делециями на карбокси-конце тяжелой цепи. Согласно конкретным вариантам осуществления окончательное разграничение CDR и идентификация остатков, содержащих сайт связывания антитела, осуществляется путем определения структуры антитела и/или определения структуры комплекса антитело-лиганд. Согласно конкретным вариантам осуществления это может быть выполнено любым из множества методов, известных специалистам в данной области техники, таких как рентгеновская кристаллография. Согласно некоторым вариантам осуществления можно использовать различные способы анализа для идентификации или аппроксимации участков CDR. Примеры таких способов включают без ограничения определение по Кабату, определение по Чотиа, определение AbM и определение контакта.

[520] Антитело с «созревшей аффинностью» представляет собой антитело с одним или несколькими изменениями в одном или нескольких его CDR, которые приводят к улучшению аффинности антитела к антигену по сравнению с исходным антителом, которое не несет такого изменения(ий). Примеры антител с созревшей аффинностью будут характеризоваться наномолярными или даже пикомолярными значениями аффинности к антигену-мишени. Антитела с созревшей аффинностью получают способами, известными в данной области техники. Marks *et al.,* (1992) *Bio/Technology* 10: 779-783 описывают созревание аффинности путем перетасовки доменов VH и VL. Случайный мутагенез CDR и/или остатков каркаса описан Barbas, *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; а селективная мутация в положениях селективного мутагенеза, положениях контакта или гипермутации с аминокислотным остатком, усиливающим активность, описана в патенте США № 6914128.

[521] Термин «антитело с привитым CDR» относится к антителам, которые содержат последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепи от одного вида, но в которых последовательности одного или нескольких участков CDR в VH и/или VL заменены на последовательности CDR другого вида, таким как антитела с мышиными

вариабельными участками тяжелой и легкой цепи, в которых один или несколько мышиных CDR (например, CDR3) заменены последовательностями CDR человека.

[522] Термин «химерное антитело» относится к антителам, которые содержат последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепи от одного вида и последовательности константных участков от другого вида, таким как антитела с мышиными вариабельными участками тяжелой и легкой цепи, связанными с человеческими константными участками.

[523] При использовании в настоящем документе термин «каркас» или «каркасная последовательность» относится к остальным последовательностям вариабельного участка за вычетом CDR. Поскольку точное определение последовательности CDR может быть выполнено по различным системам, значение каркасной последовательности подлежит, соответственно, различным интерпретациям. Шесть CDR (L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3 легкой цепи и H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 тяжелой цепи) также делят каркасные участки на легкой цепи и на тяжелой цепи на четыре субучастка (FR1, FR2, FR3 и FR4) на каждой цепи, в которых CDR1 расположен между FR1 и FR2, CDR2 между FR2 и FR3, а CDR3 между FR3 и FR4. При упоминании в других местах без указания конкретных субучастков FR1, FR2, FR3 или FR4 каркасный участок представляет собой объединенные FR в пределах вариабельного участка одной природной иммуноглобулиновой цепи. При использовании в настоящем документе FR представляет один из четырех субучастков или два или более из четырех субучастков, составляющих каркасный участок.

[524] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержат константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина из константного домена человеческого IgM, константного домена человеческого IgG, константного домена человеческого IgG1, константного домена человеческого IgG2, константного домена человеческого IgG2A, константного домена человеческого IgG2B, константного домена человеческого IgG2, константного домена человеческого IgG3, константного домена человеческого IgG3, константного домена человеческого IgG4, константного домена человеческого IgA, константного домена человеческого IgA1, константного домена человеческого IgA2, константного домена человеческого IgD или константного домена человеческого IgE. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержат константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина из константного домена человеческого IgG1 или константного домена человеческого IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержат константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина из константного домена человеческого IgG4. Согласно некоторым вариантам

осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержат константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина из константного домена человеческого IgG4 с заменой Ser на Pro в основной цепи, которая создает IgG1-подобный шарнир и обеспечивает образование межцепочечных дисульфидных связей.

[525] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, предлагаемые в настоящем документе, содержат мутации, которые придают антителам желаемые свойства. Например, во избежание потенциальных осложнений, связанных с обменом Fab-фрагментами, о котором известно, что он происходит у нативных mAb IgG4, антитела, предлагаемые в настоящем документе, 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), при которой серин 228 (по нумерация EU; остаток 241 по нумерации Кабата) превращается в пролин, что приводит к IgG1-подобной (CPPCP (SEQ ID NO: 54)) шарнирной последовательности. Соответственно, любое из антител может включать стабилизирующую мутацию «Adair» или аминокислотную последовательность CPPCP (SEQ ID NO: 54).

[526] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть дополнительно содержат константный домен легкой цепи иммуноглобулина, содержащий константный домен лямбда человеческого Ig или константный домен каппа человеческого Ig.

[527] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой IgG с четырьмя полипептидными цепями, которые представляют собой две тяжелые цепи и две легкие цепи.

[528] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело, диатело или химерное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой человеческое антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит каркас с человеческой аминокислотной последовательностью зародышевого типа.

[529] Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающая часть представляет собой Fab-фрагмент, F(ab')2-фрагмент, scFab-фрагмент или scFv-фрагмент.

[530] При использовании в настоящем документе термин «ген антитела зародышевого типа» или «фрагмент гена» относится к последовательности иммуноглобулина, кодируемой нелимфоидными клетками, которые не подвергались процессу созревания, который приводит к генетической перестройке и мутации для экспрессии конкретного иммуноглобулина (смотри, 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 согласно настоящему изобретению, проистекает из признания того, что гены антител зародышевого типа с большей вероятностью, чем зрелые гены антител, сохраняют основные структуры аминокислотной последовательности, характерные для индивидуумов данного вида, и, следовательно, с меньшей вероятностью будут распознаваться как происходящие из постороннего источника при терапевтическом применении у этого вида.

[531] При использовании в настоящем документе термин «нейтрализующий» относится к противодействию биологической активности антигена при специфическом связывании связывающего белка 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 лигандом рецептора, и уменьшает его биологическую активность по меньшей мере приблизительно на 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95%. 96%, 97%, 98%, 99% или более.

[532] Термин «связывающий белок» при использовании в настоящем документе включает любой полипептид, который специфически связывается с антигеном (например, TGFβ1), включая без ограничения антитело или его антигенсвязывающие части, DVD-IgTM, TVD-Ig, RAb-Ig, биспецифическое антитело и антитело с двойной специфичностью.

[533] Термин «моноклональное антитело» или «mAb» при использовании в контексте содержащей его композиции, может относиться к препарату антител, полученному из популяции по существу гомогенных антител, то есть отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью и направлены против одного антигена. Более того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно содержат разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое mAb направлено против одной детерминанты антигена. Модификатор «моноклональный» не следует толковать как требующий продукции антитела каким-либо конкретным способом.

[534] Термин «рекомбинантное человеческое антитело» при использовании в настоящем документе включает все человеческие антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами, такие как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (подробно описаны в разделе II C ниже), антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных 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, включены в настоящий документ посредством ссылки), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулина человека (смотри 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 включает сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат вариабельные и константные участки, происходящие от человеческих иммуноглобулиновых последовательностей зародышевого типа. Согласно конкретным вариантам осуществления, однако, такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, при использовании животного, трансгенного по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и поэтому аминокислотные последовательности участков VH и VL рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя происходят от человеческих последовательностей VH и VL зародышевого типа и являются родственными им, могут не существовать в природе в репертуаре человеческих антител зародышевого типа *in vivo*.

[535] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антигенсвязывающая часть представляют собой фрагмент антитела, например (i) Fab-фрагменты, моновалентный фрагмент состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')2-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd-фрагменты, состоящие из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагменты, состоящие из доменов VL и VH одного плеча антитела; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты; или (vii) минимальные узнающие пептиды, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельный участок антитела (например, выделенный определяющий комплементарность участок (CDR)). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антигенсвязывающая часть представляют собой (i) «иммуноглобулин с двойным вариабельным доменом» или «DVD-IgTM», (ii) «иммуноглобулин с тройным вариабельным доменом» или «TVD-Ig», (iii) «иммуноглобулин рецептор-антитело» или «RAb-Ig», (iv) «биспецифическое антитело» или (v) «антитело с двойной специфичностью».

[536] При использовании в настоящем документе «иммуноглобулин с двойным вариабельным доменом» или «DVD-IgTM» и аналогичные термины относятся к

связывающим белкам, содержащим парные DVD-полипептид тяжелой цепи и DVD-полипептид легкой цепи, причем каждая пара тяжелой и легкой цепи обеспечивает два антигенсвязывающих сайта. Каждый сайт связывания включает всего 6 CDR, участвующих в связывании антигена, на каждый антигенсвязывающий сайт. DVD-IgTM обычно содержит два плеча, связанных друг с другом по меньшей мере частично за счет димеризации доменов CH3, причем каждое плечо DVD является биспецифическим, что обеспечивает иммуноглобулин с четырьмя сайтами связывания. DVD-IgTM представлены в публикации патента США № 2010/0260668 и патенте США № 9109026, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки, включая перечни последовательностей.

[537] При использовании в настоящем документе «иммуноглобулин с тройным вариабельным доменом» или «TVD-Ig» и аналогичные термины относятся к связывающим белкам, содержащим парные TVD-полипептид тяжелой цепи связывающего белка и TVD-полипептид легкой цепи связывающего белка, причем каждая пара тяжелой и легкой цепи обеспечивает три антигенсвязывающих сайта. Каждый сайт связывания включает всего 6 CDR, участвующих в связывании антигена, на каждый антигенсвязывающий сайт. Связывающий белок TVD может содержать два плеча, связанные друг с другом по меньшей мере частично за счет димеризации доменов CH3, причем каждое плечо связывающего белка TVD является триспецифическим, что обеспечивает связывающий белок с шестью сайтами связывания.

[538] При использовании в настоящем документе «иммуноглобулин рецептор-антитело» или «RAb-Ig» и аналогичные термины относятся к связывающим белкам, содержащим RAb-полипептид тяжелой цепи и RAb-полипептид легкой цепи, которые вместе образуют в общей сложности три антигенсвязывающих сайта. Один антигенсвязывающий сайт образуется путем спаривания вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей антитела, присутствующих в каждом RAb-полипептиде тяжелой цепи и RAb-полипептиде легкой цепи, с образованием одного сайта связывания с 6 CDR, обеспечивающими первый антигенсвязывающий сайт. Каждый RAb-полипептид тяжелой цепи и RAb-полипептид легкой цепи содержит рецепторную последовательность, которая независимо связывает лиганд, обеспечивая второй и третий связывающие «антиген» сайты. Обычно RAb-Ig содержит два плеча, связанные друг с другом по меньшей мере частично за счет димеризации 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, содержание которой, включая списки

последовательностей, включено в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте).

[539] Термин «биспецифическое антитело» при использовании в настоящем документе в отличие от «биспецифического связывающего белка полу-Ig» или «биспецифического связывающего белка (полу-Ig)» относится к полноразмерным антителам, которые создают с помощью технологии квадромы (смотри Milstein, C. and Cuello, A.C. (1983) *Nature* 305(5934): p. 537-540), путем химической конъюгации двух различных моноклональных антител (смотри Staerz, U.D. *et al.,* (1985) *Nature* 314(6012): 628-631) или с помощью подхода «выступ-во-впадину» или аналогичных подходов, которые вносят мутации в Fc-участок, которые не ингибируют димеризацию CH3-CH3 (смотри 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 плеч (одна пара HC/LC) и связывает другой антиген (или эпитоп) на своем втором плече (другая пара HC/LC). ЛК). Согласно этому определению, биспецифическое антитело содержит два различных антигенсвязывающих плеча (как по специфичности, так и по последовательностям CDR) и является моновалентным для каждого антигена, с которым оно связывается.

[540] Термин «антитело с двойной специфичностью» при использовании в настоящем документе и в отличие от биспецифического связывающего белка полу-Ig или биспецифического связывающего белка относится к полноразмерным антителам, которые могут связывать два различных антигена (или эпитопа) в каждом из двух своих связывающих плеч (пара HC/LC) (смотри публикацию PCT № WO 02/02773). Соответственно, связывающий белок с двойной специфичностью содержит два идентичных антигенсвязывающих плеча с идентичной специфичностью и идентичными последовательностями CDR и является бивалентным для каждого антигена, с которым он связывается.

[541] Термин «Kon» при использовании в настоящем документе предназначен для обозначения константы скорости образования при ассоциации связывающего белка (например, антитела) с антигеном с образованием, например, комплекса антитело-антиген, как известно в данной области техники. «Kon» также известна под терминами «константа скорости ассоциации» или «ka», которые используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Это значение, указывающее на скорость связывания антитела со своим

антигеном-мишенью или скорость образования комплекса между антителом и антигеном, также показано в уравнении: антитело («Ab») + антиген («Ag»)→Ab-Ag.

Термин «Koff» при использовании в настоящем документе предназначен для обозначения константы скорости распада при диссоциации связывающего белка (например, антитела) от, например, комплекса антитело-антиген, как известно в данной области техники. «Koff» также известна под терминами «константа скорости диссоциации» или «kdis», которые используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Это значение указывает на скорость диссоциации антитела от своего антигена-мишени или разъединения комплекса Ab-Ag со временем на свободное антитело и антиген, как показано в уравнении: Ab + Ag←Ab-Ag.

[542] Термины «равновесная константа диссоциации» или «KD», используемые взаимозаменяемо в настоящем документе, относятся к значению, получаемому при измерении титрования при равновесии 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 данной области техники. Использование методов на основе флуоресценции обеспечивает высокую чувствительность и возможность исследовать образцы в физиологических буферах в равновесии. Можно использовать другие экспериментальные подходы и аппараты, такие как анализ BIACORE® (анализ биомолекулярного взаимодействия) (например, аппарат, доступный от BIAcore International AB компании GE Healthcare, Uppsala, Швеция). Кроме того, также можно использовать анализ KinExA® (анализ кинетического исключения), доступный от Sapidyne Instruments (Boise, Idaho).

[543] Термины «кристаллический» и «кристаллизованный» при использовании в настоящем документе относятся к связывающему белку (например, антителу) или его антигенсвязывающей части, которые существуют в форме кристалла. Кристаллы представляют собой одну из форм твердого состояния вещества, которая отличается от других форм, таких как аморфное твердое состояние или жидкокристаллическое состояние. Кристаллы состоят из правильных повторяющихся трехмерных массивов атомов, ионов, молекул (например, белков, таких как антитела) или молекулярных ансамблей (например, комплексов антиген-антитело). Эти трехмерные массивы организованы в соответствии с определенными математическими соотношениями, которые хорошо известны в данной области. Фундаментальная единица или строительный блок, который повторяется в

кристалле, называется асимметричной единицей. Повторение асимметричной единицы в расположении, которое соответствует данной четко определенной кристаллографической симметрии, обеспечивает «элементарную ячейку» кристалла. Повторение элементарной ячейки путем регулярного параллельного переноса во всех трех измерениях дает кристалл. Смотри Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999).

[544] Термин «линкер» используется для обозначения полипептидов, содержащих два или более аминокислотных остатка, соединенных пептидными связями, и используемых для связывания одной или нескольких антигенсвязывающих частей. Такие линкерные полипептиды хорошо известны в данной области техники (смотри, например, Holliger, P. *et al.,* (1993) P*roc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak, R.J. *et al.,* (1994) *Structure* 2:1121-1123). Примеры линкеров включают без ограничения ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 55), ASTKGP (SEQ ID NO: 56); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 57); TVAAP (SEQ ID NO: 58); AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 59); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 60); AKTTPKLGG (SEQ ID NO: 61); SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 62); SAKTTP (SEQ ID NO: 63); RADAAP (SEQ ID NO: 64); RADAAPTVS (SEQ ID NO: 65); RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 66); RADAAAA(G4S)4 (SEQ ID NO: 67); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 68); ADAAP (SEQ ID NO: 69); ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 70); QPKAAP (SEQ ID NO: 71); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 72); AKTTPP (SEQ ID NO: 73); AKTTPPSVTPLAP (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); GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 80); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 81); и ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 82).

[545] «Метка» и «детектируемая метка» или «детектируемый фрагмент» означают фрагмент, присоединенный к партнеру по специфическому связыванию, такому как антитело или аналит, например, для осуществления реакции между членами пары специфического связывания, такой как антитело и детектируемый аналит, и партнер по специфическому связыванию, например антитело или аналит, помеченный таким образом, называются «детектируемо меченым». Таким образом, термин «меченый связывающий белок» при использовании в настоящем документе относится к белку с включенной в него меткой, которая обеспечивает идентификацию связывающего белка. Согласно одному варианту осуществления метка представляет собой детектируемый маркер, который может подавать сигнал, который можно детектировать с помощью визуальных или инструментальных средств, например включение радиоактивно меченой аминокислоты

или присоединение к полипептиду биотинильных фрагментов, которые можно детектировать с помощью меченого авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которую можно детектировать оптическими или колориметрическими способами). Примеры меток для полипептидов включают без ограничения следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho и ^{153}Sm); хромогены; флуоресцентные метки (например, FITC, родамин и лантанидные люминофоры); ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, люцифераза и щелочная фосфатаза); хемилюминесцентные маркеры; биотинильные группы; предварительно определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой застежки, сайты связывания вторичных антител, домены связывания металлов и эпитопные метки); и магнитные средства, такие как хелаты гадолиния. Репрезентативные примеры меток, обычно используемых для иммунологических анализов, включают фрагменты, которые дают свет, например соединения акридиния, и фрагменты, которые дают флуоресценцию, например флуоресцеин. Другие метки описаны в настоящем документе. В связи с этим сам фрагмент может не быть детектируемо меченым, но может стать детектируемым при реакции с еще одним фрагментом. Использование термина «детектируемо меченый» предназначено для охвата последнего типа детектируемого мечения.

[546] Согласно некоторым вариантам осуществления аффинность связывания антитела или его антигенсвязывающей части с антигеном (например, белковым комплексом), таким как комплексы презентирующая молекула-proTGFβ1, определяют с использованием анализа Octet. Согласно некоторым вариантам осуществления анализ Octet представляет собой анализ, в котором определяют один или несколько кинетических параметров, указывающих на связывание между антителом и антигеном. Согласно некоторым вариантам осуществления систему OCTET® (FORTEBIO®, Menlo Park, CA) используют для определения аффинности связывания антитела или его антигенсвязывающей части с комплексами презентирующая молекула-proTGFβ1. Например, аффинность связывания антител может быть определена с помощью системы анализа без мечения с использованием тест-полосок FORTEBIO® Octet Qke, использующей интерферометрию биослоев. Согласно некоторым вариантам осуществления антигены иммобилизованы на биосенсорах (например, покрытых стрептавидином биосенсорах), и антитела и комплексы (например, биотинилированные комплексы презентирующая молекула-proTGFβ1) присутствуют 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 презентирующая молекула-proTGFβ1 определяют с использованием протокола, представленного в **таблице 14**.

[547] Антитела согласно настоящему изобретению включают pH-чувствительные антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления такие антитела или их фрагменты связывают целевой комплекс pH-зависимым образом, так что относительно высокая аффинность связывания имеет место при нейтральном или физиологическом pH, но антитело быстрее диссоциирует от своего антигена при кислом pH; или скорость диссоциации выше при кислом pH, чем при нейтральном pH. Такие антитела или их фрагменты могут функционировать как рециркулирующие антитела. Такие антитела также могут называться «pH-чувствительными» антителами.

[548] Таким образом, настоящее изобретение охватывает pH-чувствительные антитела, которые селективно связывают комплекс proTGFβ1, характеризующиеся тем, что эти антитела имеют более низкую скорость диссоциации при нейтральном pH (например, приблизительно pH 7) по сравнению с кислым pH (например, приблизительно pH 5). Профили pH-зависимого связывания одного такого антитела представлены в примере 14 в настоящем документе.

[549] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению могут индуцировать интернализацию комплекса, содержащего proTGFβ1, связанный с LRRC33 или GARP, на клеточной поверхности. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела являются ингибиторами клеточно-ассоциированного TGFβ1 (например, GARP-презентируемого proTGFβ1 и LRRC33-презентируемого proTGFβ1), соответственно, настоящее изобретение относится к антителам или их фрагментам, которые специфически связывают такой комплекс (например, GARP-proTGFβ1/латентный TGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1/латентный TGFβ1), тем самым вызывая интернализацию комплекса (например, эндоцитоз). Этот способ действия вызывает удаление или истощение неактивных комплексов TGFβ1 с клеточной поверхности (например, Treg, макрофагов, MDSC и так далее), тем самым уменьшая количество латентного TGFβ1, доступного для активации. Такие антитела или их фрагменты могут функционировать как рециркулирующие антитела. Такие антитела также могут называться «pH-чувствительными» антителами.

[550] Согласно некоторым вариантам осуществления такие «pH-чувствительные» антитела характеризуются K_{dis} (так же называемой K_{off}) $\geq 5\times10^{-3}$ c^{-1} (например, $\geq 5{,}1\times10^{-3}$, $\geq 5{,}2\times10^{-3}$, $\geq 5{,}3\times10^{-3}$, $\geq 5{,}4\times10^{-3}$, $\geq 5{,}5\times10^{-3}$, $\geq 5{,}6\times10^{-3}$, $\geq 5{,}7\times10^{-3}$, $\geq 5{,}8\times10^{-3}$, $\geq 5{,}9\times10^{-3}$ или $\geq 6{,}0\times10^{-3}$) при pH 5 при измерении с помощью подходящего анализа аффинности

(например, интерферометрии биослоев, поверхностного плазмонного резонанса и/или титрования при равновесии в растворе). Согласно конкретному варианту осуществления такие «pH-чувствительные» антитела характеризуются $K_{dis} \geq 5{,}6 \times 10^{-3}$ при pH 5.

Согласно некоторым вариантам осуществления такие «pH-чувствительные» антитела характеризуются отношением pH 5 K_{dis} к pH 7 K_{dis} (то есть, K_{dis} при pH 5: K_{dis} при pH 7) ≥1,5 (например, ≥1,6, ≥1,7, ≥1,8, ≥1,9 или ≥2,0) при измерении с помощью подходящего анализа аффинности (например, интерферометрии биослоев, поверхностного плазмонного резонанса и/или титрования при равновесии в растворе). Согласно конкретному варианту осуществления такие «pH-чувствительные» антитела характеризуются отношением K_{dis} ≥2,0 при измерении с помощью интерферометрии биослоев.

Процесс скрининга; производство

[551] Настоящее изобретение охватывает способы скрининга, способы получения и способы производства антител или их фрагментов, которые связываются и диссоциируют с низкой скоростью от каждого из комплекса hGARP-proTGFβ1, комплекса hLTBP1-proTGFβ1, комплекса hLTBP3-proTGFβ1 и комплекса hLRRC33-proTGFβ1, и фармацевтические композиции и содержащие их соответствующие наборы.

[552] Способы получения фармацевтической композиции, содержащей антитело (или генноинженерную конструкцию, содержащую его антигенсвязывающий фрагмент), требуют идентификации и отбора таких антител с желаемыми свойствами. При этом настоящее изобретение включает признание того, что антитела с низкими значениями k_{OFF} (то есть скорости распада) могут обеспечивать продолжительность действия, отражающую механизм действия этих ингибиторов активации, которые не полагаются на способность быстро конкурировать за связывание с эндогенными рецепторами, а скорее оказывают ингибирующее действие, фиксируясь на неактивных латентных формах TGFβ1 в ткани. Способность оставаться связанным с латентным антигенным комплексом (соответствующая низкой скорости диссоциации) может обеспечивать продолжительную активность *in vivo*.

[553] Соответственно, настоящее изобретение относится к способу производства фармацевтической композиции, содержащей TGFβ1-селективный ингибитор активации, причем способ предусматривает стадии: выбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают человеческий LLC с низкой скоростью диссоциации (например, ниже 10,0E-4 (1/c)) или длительным периодом полужизни (например, t½ по меньшей мере 90 минут), и производства антитела в больших масштабах.

[554] Выбор ингибиторов с подходящей скоростью распада (низкой диссоциацией) может быть определен с помощью моновалентных антител (например, Fab-фрагментов) или полноразмерных антител (например, IgG).

[555] Согласно некоторым вариантам осуществления стадия производства предусматривает культуру клеток млекопитающих с объемом 250 л или больше, например 1000 л, 2000 л, 3000 л, 4000 л. Способ может дополнительно предусматривать стадию очистки антитела от клеточной культуры и, необязательно, включения очищенного антитела в фармацевтическую композицию. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает стадию тестирования выбранного антитела в подходящей доклинической модели на эффективность и безопасность и подтверждения того, что антитело эффективно при NOAEL. Оценка безопасности может включать токсикологическое исследование *in vivo*, содержащее гистопатологию и иммунологическую оценку безопасности, включая, например, анализы высвобождения цитокинов *in vitro* и анализы тромбоцитов.

[556] Для достижения продолжительного ингибирующего действия для терапевтического применения и/или крупномасштабного производства согласно настоящему изобретению могут быть выбраны антитела со скоростью диссоциации (например, скоростью одновалентной диссоциации) не больше 10,0E-4 (c^{-1}) (например, 5,0E-4 или меньше, 1,0E-4 или меньше, 5,0E-5 или меньше).

[557] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, выбранные для применения или производства согласно настоящему изобретению, содержат следующие шесть последовательностей CDR: H-CDR1 может содержать последовательность GFTFADYA (SEQ ID NO: 276); H-CDR2 может содержать последовательность ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282); H-CDR3 может содержать последовательность, представленную формулой $VSSGX_1WDX_2D$, где, необязательно, X_1 представляет собой H или Q, и где, также необязательно, X_2 представляет собой Y или F (SEQ ID NO: 283); L-CDR1 может содержать последовательность QSISSY (SEQ ID NO: 279); L-CDR2 может содержать последовательность AASGLES (SEQ ID NO: 284); и L-CDR3 может содержать последовательность QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285). Согласно предпочтительным вариантам осуществления H-CDR3 может содержать последовательность VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывают эпитоп, который содержит один или несколько из следующих аминокислотных остатков последовательности полипептида proTGFβ1: S35, G37, E38, V39, P40, P41, G42, P43, R274, K280, H283 и K309.

[558] для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению можно применять ряд способов. Например, антитела могут быть получены с использованием способов рекомбинантной ДНК. Моноклональные антитела могут также быть получены путем создания гибридом (смотри, например, Kohler and Milstein (1975) Nature, 256: 495-499) в соответствии с известными способами. Гибридомы, образовавшиеся таким образом, затем подвергают скринингу с использованием стандартных способов, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и анализ с помощью поверхностного плазмонного резонанса (например, OCTET® или BIACORE®), для идентификации одной или нескольких гибридом, продуцирующих антитело, которое специфически связывается с указанным антигеном. В качестве иммуногена можно использовать любую форму указанного антигена, например рекомбинантный антиген, встречающиеся в природе формы, любые их варианты или фрагменты, а также их антигенный пептид (например, любой из эпитопов, описанных в настоящем документе, как линейный эпитоп или внутри каркаса как конформационный эпитоп). Один пример способа получения антитела предусматривает скрининг библиотек экспрессии белков, которые экспрессируют антитела или их фрагменты (например, scFv), например библиотек фагового или рибосомного дисплея. Фаговый дисплей описан, например, в документах Ladner *et al.*, патент 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.

[559] Помимо использования библиотек дисплея указанный антиген (например, комплексы презентирующая молекула-TGFβ1) можно использовать для иммунизации отличного от человека хозяина, например, кролика, морской свинки, крысы, мыши, хомяка, овцы, козы, курицы, верблюдовых, а также отличных от млекопитающих хозяев, таких как акула. Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное представляет собой мышь.

[560] Согласно другому варианту осуществления моноклональное антитело получают от отличного от человека животного и затем модифицируют, например химеризуют, с использованием подходящих методов рекомбинантной ДНК. Описаны различные подходы к получению химерных антител. Смотри, 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 EP171496; публикация европейского патента 0173494, патент Великобритании GB 2177096B.

[561] Дополнительные методы получения антител смотри в Antibodies: A Laboratory Manual, eds. Harlow *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Настоящее изобретение не обязательно ограничено каким-либо конкретным источником, способом получения или другими особыми характеристиками антитела.

[562] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к клеткам-хозяевам, трансформированным полинуклеотидом или вектором. Клетки-хозяева могут представлять собой прокариотическую или эукариотическую клетку. Полинуклеотид или вектор, который присутствует в клетке-хозяине, может или быть интегрирован в геном клетки-хозяина, или оставаться вне хромосомы. 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 все бактерии, которые могут быть трансформированы или трансфицированы молекулами ДНК или РНК для экспрессии антитела или соответствующих иммуноглобулиновых цепей. К прокариотическим хозяевам могут относиться как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии, такие как, например, *E. coli, S. typhimurium, Serratia marcescens* и *Bacillus subtilis*. Термин «эукариотический» включает клетки дрожжей, высших растений, насекомых и позвоночных, например клетки млекопитающих, такие как клетки NSO и CHO. В зависимости от хозяина, используемого в процедуре рекомбинантного получения, антитела или иммуноглобулиновые цепи, кодируемые полинуклеотидом могут быть гликозилированными или негликозилированными. Антитела или соответствующие иммуноглобулиновые цепи могут также включать начальный аминокислотный остаток метионина.

[563] Согласно некоторым вариантам осуществления после включения вектора в соответствующего хозяина, хозяина можно поддерживать в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей и, при желании, для сбора и очистки иммуноглобулиновых легких цепей, тяжелых цепей, димеров легкая/тяжелая цепь или интактных антител, антигенсвязывающих фрагментов или других иммуноглобулиновых форм, которые могут последовать; смотри Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N.Y., (1979). Таким образом, полинуклеотиды или векторы вводят в клетки, которые в свою очередь продуцируют антитело или антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, трансгенных животных, предпочтительно млекопитающих, содержащих указанные выше клетки-хозяева, можно использовать для крупномасштабного получения антитела или фрагментов антитела. При использовании в

настоящем документе «крупномасштабное» получение включает объем по меньшей мере 250 л. Обычно биореакторы коммерческого масштаба, используемые для производства биологических препаратов, имеют объем в диапазоне 1000-12000 л.

[564] Трансформированные клетки-хозяева можно выращивать в ферментерах и культивировать с использованием любых подходящих методов для достижения оптимального роста клеток. После экспрессии целые антитела, их димеры, отдельные легкие и тяжелые цепи, другие формы иммуноглобулинов или антигенсвязывающие фрагменты могут быть очищены в соответствии со стандартными процедурами в данной области техники, включая осаждение сульфатом аммония, аффинные колонки, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и аналогичные методы; смотри Scopes, Protein Purification, Springer Verlag, N.Y. (1982). Затем антитело или антигенсвязывающие фрагменты можно выделять из среды для выращивания, клеточных лизатов или фракций клеточных мембран. Выделение и очистка, например, микробиологически экспрессируемых антител или антигенсвязывающих фрагментов могут быть осуществлены любыми обычными средствами, такими как, например, препаративное хроматографическое разделение и иммунологическое разделение, такое как предусматривающее использование моноклональных или поликлональных антител, направленных, например, на константный участок антитела.

[565] Аспекты настоящего изобретения относятся к гибридоме, которая обеспечивает источник моноклональных антител неопределенной продолжительности. В качестве альтернативы получению иммуноглобулинов непосредственно из культуры гибридом можно использовать иммортализованные гибридомные клетки в качестве источника перегруппированных локусов тяжелой цепи и легкой цепи для последующей экспрессии и/или генетических манипуляций. Перегруппированные гены антител могут быть подвергнуты обратной транскрипции с соответствующих иРНК для получения кДНК. Согласно некоторым вариантам осуществления константный участок тяжелой цепи может быть заменен на участок другого изотипа или полностью удален. Вариабельные участки можно связывать для кодирования одноцепочечных Fv-участков. Несколько Fv-участков можно связывать для придания способности связывания более чем одной мишени, или можно использовать химерные комбинации тяжелой и легкой цепей. Для клонирования вариабельных областей антител и получения рекомбинантных антител можно использовать любой подходящий метод способ.

[566] Согласно некоторым вариантам осуществления подходящую нуклеиновую кислоту, которая кодирует вариабельные участки тяжелой и/или легкой цепи, получают и встраивают в векторы экспрессии, которые можно трансфицировать в стандартные

рекомбинантные клетки-хозяева. Можно использовать множество таких клеток-хозяев. Согласно некоторым вариантам осуществления для эффективного процессинга и получения могут быть полезны клетки-хозяева млекопитающих. Типичные клеточные линии млекопитающих, пригодные для этой цели, включают 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 получены путем их выделения из культуры. Системы экспрессии могут быть сконструированы так, чтобы включать сигнальные пептиды, так что полученные антитела секретируются в среду; однако также возможно внутриклеточное производство.

[567] Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему по меньшей мере вариабельный участок иммуноглобулиновой цепи антител, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления вариабельный участок, кодируемый полинуклеотидом, содержит по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) из VH и/или VL вариабельного участка антитела, продуцируемого любой из описанных выше гибридом.

[568] Полинуклеотиды, кодирующие антитело или антигенсвязывающие фрагменты, могут представлять собой, например, ДНК, кДНК, РНК, или синтетически полученные ДНК или РНК, или рекомбинантно полученную химерную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую любой из этих полинуклеотидов или отдельно, или в комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотид является частью вектора. Такие векторы могут содержать дополнительные гены, такие как маркерные гены, которые обеспечивают отбор вектора в подходящей клетке-хозяине и в подходящих условиях.

[569] Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотид функционально связан с последовательностями контроля экспрессии, что обеспечивает экспрессию в прокариотических или эукариотических клетках. Экспрессия полинуклеотида включает транскрипцию полинуклеотида в транслируемую иРНК. Регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию в эукариотических клетках, предпочтительно в клетках млекопитающих, хорошо известны специалистам в данной области техники. К ним могут относиться регуляторные последовательности, облегчающие инициацию транскрипции, и, необязательно, поли-А-сигналы, облегчающие терминацию транскрипции и стабилизацию транскрипта. Дополнительные регуляторные элементы могут включать транскрипционные, а также трансляционные энхансеры и/или природные

или гетерологичные промоторные участки. Возможные регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию в прокариотических клетках-хозяевах, включают, например, промоторы PL, Lac, Trp или Tac в *E. coli*, а примерами регуляторных элементов, обеспечивающих экспрессию в эукариотических клетках-хозяевах, являются промоторы AOX1 или GAL1 в дрожжах или CMV-промотор, SV40-промотор, RSV-промотор (вирус саркомы Рауса), CMV-энхансер, SV40-энхансер или глобиновый интрон в клетках млекопитающих и других животных.

[570] Помимо элементов, ответственных за инициацию транскрипции, такие регуляторные элементы могут также включать сигналы терминации транскрипции, такие как сайт SV40-poly-A или сайт tk-poly-A, ниже полинуклеотида. Кроме того, в зависимости от используемой системы экспрессии лидерные последовательности, способные направлять полипептид в клеточный компартмент или секретировать его в среду, могут быть добавлены к кодирующей последовательности полинуклеотида и были описаны ранее. Лидерную последовательность(и) собирают в соответствующей фазе с последовательностями трансляции, инициации и терминации, и, предпочтительно, лидерная последовательность способна направлять секрецию транслируемого белка или его части, например, во внеклеточную среду. Необязательно, можно использовать гетерологичную полинуклеотидную последовательность, которая кодирует слитый белок, содержащий C- или N-концевой сигнальный пептид, придающий желаемые характеристики, например стабилизацию или упрощенную очистку экспрессируемого рекомбинантного продукта.

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

[572] Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности контроля экспрессии в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева, представлены в виде эукариотических промоторных систем, но также можно использовать последовательности контроля для прокариотических

хозяев. Векторы экспрессии, получаемые из вирусов, таких как ретровирусы, вирус осповакцины, аденоассоциированный вирус, вирусы герпеса или вирус папилломы крупного рогатого скота, можно использовать для доставки полинуклеотидов или вектора в популяцию клеток-мишеней (например, для создания клетки для экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента). Для конструирования рекомбинантных вирусных векторов можно использовать множество подходящих способов. Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотиды и векторы могут быть для доставки в клетки-мишени преобразованы в липосомы. Векторы, содержащие полинуклеотиды (например, кодирующие последовательности тяжелого и/или легкого вариабельного домена(ов) иммуноглобулиновых цепей и последовательности контроля экспрессии), могут быть перенесены в клетку-хозяина подходящими способами, которые могут быть различными в зависимости от типа клеточного хозяина.

[573] Способы скрининга могут предусматривать стадию оценки или подтверждения желаемой активности антитела или его фрагмента. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия предусматривает отбор на способность ингибировать целевую функцию, например ингибирование высвобождения зрелого/растворимого фактора роста (например, TGFβ1) из латентного комплекса. Согласно предпочтительным вариантам осуществления такая стадия предусматривает анализ клеточной активности, в котором оценивают ингибирующее действие исследуемого антитела или антител путем измерения уровня высвобождения фактора роста в среду (например, раствор для анализа) после активации, когда комплекс proTGFβ экспрессируется на клеточной поверхности или присутствует в ECM. Уровень высвобождения фактора роста в среду/раствор можно оценивать, например, путем измерения активности TGFβ. Неограничивающие примеры применимых анализов клеточной активности описаны ниже (смотри, например, «*клеточные анализы для измерения активации и/или ингибирующей активности TGFβ*») и в примере 3 в настоящем документе.

[574] Согласно некоторым вариантам осуществления способ скрининга предусматривает стадию удаления антител, которые характеризуются IC50 больше 5 нМ (например, больше 10 нМ) при измерении с помощью подходящего клеточного анализа активности. Согласно некоторым вариантам осуществления способ скрининга предусматривает стадию удаления антител, которые характеризуются IC50 больше 5 нМ (например, больше 10 нМ) при измерении с помощью подходящего клеточного анализа активности в отношении LTBP1-TGFβ1, LTBP3-TGFβ1, GARP-TGFβ1 и/или LRRC33-TGFβ1.

[575] Согласно некоторым вариантам осуществления способ скрининга предусматривает стадию отбора антител на основании их предпочтения (или отсутствия предпочтения) в отношении аффинности к одному или нескольким комплексам презентирующая молекула-TGFb1. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления способ скрининга предусматривает отбор антител, характеризующихся предпочтением матрикс-ассоциированных комплексов TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления способ скрининга предусматривает отбор антител, характеризующихся относительно эквивалентной аффинностью к комплексу GARP-TGFβ1, комплексу LTBP1-TGFβ1, комплексу LTBP3-TGFβ1 и комплексу LRRC33-TGFβ1.

[576] Согласно некоторым вариантам осуществления способ скрининга предусматривает стадию отбора антител или их фрагментов, которые индуцируют ADCC. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия содержит отбор антител или их фрагментов, которые накапливаются в желаемом месте(ах) *in vivo* (например, типе клеток, ткани или органе). Согласно некоторым вариантам осуществления стадия содержит отбор антител или их фрагментов, способных преодолевать гематоэнцефалический барьер. Способы могут, необязательно, предусматривать стадию оптимизации одного или нескольких антител или их фрагментов для получения альтернативных аналогов, которые обладают желаемыми профилями, определяемыми такими критериями, как стабильность, аффинность связывания, функциональность (например, ингибирующее действие, Fc-функция и так далее), иммуногенность, pH-чувствительность и пригодность для разработки (например, высокая растворимость, низкая самоассоциация и так далее).

[577] Согласно некоторым вариантам осуществления способ скрининга предусматривает стадию отбора антител, которые являются pH-чувствительными. Согласно некоторым вариантам осуществления способ скрининга предусматривает стадию отбора антител, которые характеризуются K_{dis} $\geq 5\times10^{-3}$ c^{-1} (например, $\geq 5{,}1\times10^{-3}$, $\geq 5{,}2\times10^{-3}$, $\geq 5{,}3\times10^{-3}$, $\geq 5{,}4\times10^{-3}$, $\geq 5{,}5\times10^{-3}$, $\geq 5{,}6\times10^{-3}$, $\geq 5{,}7\times10^{-3}$, $\geq 5{,}8\times10^{-3}$, $\geq 5{,}9\times10^{-3}$ или $\geq 6{,}0\times10^{-3}$) при pH 5 при измерении с помощью подходящего анализа аффинности (например, интерферометрии биослоев, поверхностного плазмонного резонанса и/или титрования при равновесии в растворе). Согласно некоторым вариантам осуществления способ скрининга предусматривает стадию отбора антител, которые характеризуются отношением pH 5 K_{dis} к pH 7 K_{dis} (то есть, K_{dis} при pH 5: K_{dis} при pH 7) $\geq 1{,}5$ (например, $\geq 1{,}6$, $\geq 1{,}7$, $\geq 1{,}8$, $\geq 1{,}9$ или $\geq 2{,}0$) при измерении с помощью подходящего анализа аффинности (например, интерферометрии биослоев, поверхностного плазмонного резонанса и/или титрования при равновесии в растворе).

[578] Согласно некоторым вариантам осуществления способ скрининга предусматривает стадию отбора антител, обладающих перекрестной реактивностью с proTGFβ1 других видов (например, мыши, крысы и/или яванского макака).

Модификации

[579] Антитела или их антигенсвязывающие части согласно настоящему изобретению могут быть модифицированы с помощью детектируемой метки или детектируемого фрагмента, включая без ограничения фермент, простетическую группу, флуоресцентный материал, люминесцентный материал, биолюминесцентный материал, радиоактивный материал, позитрон-излучающий металл, нерадиоактивный парамагнитный металлический ион и аффинную метку, для детектирования и выделения комплекса GARP-proTGFβ1, комплекса LTBP1-proTGFβ1, комплекса LTBP3-proTGFβ1 и/или комплекса LRRC33-proTGFβ1. Детектируемое вещество или фрагмент могут быть связаны или конъюгированы или непосредственно с полипептидами согласно настоящему изобретению или опосредованно через промежуточное звено (такое как, например, линкер (например, расщепляемый линкер)) с использованием подходящих методов. Неограничивающие примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β-галактозидазу, глюкозооксидазу или ацетилхолинэстеразу; неограничивающие примеры подходящих комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; неограничивающие примеры подходящих флуоресцентных материалов включают биотин, умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного материала включает люминол; неограничивающие примеры биолюминесцентных материалов включают люциферазу, люциферин и экворин; и примеры подходящего радиоактивного материала включают ион радиоактивного металла, например альфа-излучатели или другие радиоизотопы, такие как, например, йод (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^{3}H), индий (^{115}mIn, ^{113}mIn, ^{112}In, ^{111}In) и технеций (^{99}Tc, ^{99}mTc), таллий (^{201}Ti), галлий (^{68}Ga, ^{67}Ga), палладий (^{103}Pd), молибден (^{99}Mo), ксенон (^{133}Xe), фтор (^{18}F), ^{153}Sm, Lu, ^{159}Gd, ^{149}Pm, ^{140}La, ^{175}Yb, ^{166}Ho, ^{90}Y, ^{47}Sc, ^{86}R, ^{188}Re, ^{142}Pr, ^{105}Rh, ^{97}Ru, ^{68}Ge, ^{57}Co, ^{65}Zn, ^{85}Sr, ^{32}P, ^{153}Gd, ^{169}Yb, ^{51}Cr, ^{54}Mn, ^{75}Se, цирконий (^{89}Zr) и олово (^{113}Sn, ^{117}Sn). Детектируемое вещество может быть связано или конъюгировано или непосредственно с антителами согласно настоящему изобретению, которые связываются специфически с комплексом GARP-proTGFβ1, комплексом LTBP1-proTGFβ1, комплексом LTBP3-proTGFβ1 и/или комплексом LRRC33-proTGFβ1 или любыми их компонентами, или опосредованно через промежуточное звено (такое как, например, линкер) с использованием подходящих методов. Любое из антител, представленных в настоящем документе, которое

конъюгировано с детектируемым веществом, можно использовать для любых подходящих диагностических анализов, таких как описанные в настоящем документе. Такой анализы включают визуализацию *in vivo*, которую можно применять для мониторинга прогрессирования заболевания и/или ответа на терапию, такую как терапия ингибированием TGFβ1, описанная в настоящем документе.

[580] Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие части согласно настоящему изобретению могут также быть модифицированы с помощью лекарственного средства. Лекарственное средство может быть связано или конъюгировано или непосредственно с полипептидами согласно настоящему изобретению, или опосредованно через промежуточное звено (такое как, например, линкер (например, расщепляемый линкер)) с использованием подходящих методов.

Фармацевтические композиции и составы

[581] Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, используемым в качестве лекарственного препарата, подходящего для введения человеку и отличным от человека субъектам. Одно или несколько изоформно-специфичных антител, описанных в настоящем изобретении, могут быть составлены или смешаны с фармацевтически приемлемым носителем (вспомогательным средством), включая, например, буфер, с образованием фармацевтической композиции. Такие составы можно применять для лечения заболевания или нарушения, которое связано с TGFβ-сигнализацией. Согласно особенно предпочтительным вариантам осуществления такие составы можно использовать для применения в иммуноонкологии.

[582] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить пациентам для облегчения связанного с TGFβ1 показания (например, фиброза, иммунных нарушений и/или рака). «Приемлемый» означает, что носитель совместим с активным ингредиентом композиции (и, предпочтительно, способен стабилизировать активный ингредиент) и не вреден для субъекта, подлежащего лечению. Примеры фармацевтически приемлемых вспомогательных средств (носителей), включая буферы, очевидны для специалиста в данной области техники и описаны ранее. Смотри, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover. В одном примере фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, содержит более одного антитела, которое специфически связывает комплекс GARP-proTGFβ1, комплекс LTBP1-proTGFβ1, комплекс LTBP3-proTGFβ1 и комплекс LRRC33-proTGFβ1, причем антитела распознают различные эпитопы/остатки комплекса.

[583] Фармацевтические композиции для использования в способах согласно настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные средства 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 средства или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и могут включать буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстраны; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN^{TM}, PLURONIC® или полиэтиленгликоль (PEG). Фармацевтически приемлемые вспомогательные средства описаны далее в настоящем документе.

[584] Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые содержат антитело или его фрагмент в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

[585] Таким образом, антитело или молекула, содержащая антигенсвязывающий фрагмент такого антитела, могут быть включены в фармацевтическую композицию, подходящую для введения человеку.

[586] Фармацевтический состав может включать одно или несколько вспомогательных средств. Согласно некоторым вариантам осуществления вспомогательное средство(а) может быть выбрано из списка, доступного по следующей ссылке: accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.Cfm?event=browseByLetter.page&Letter=A.

[587] Фармацевтическую композицию составляют с конечной концентрацией активного биологического препарата (например, моноклонального антитела, сконструированной связывающей молекулы, содержащей антигенсвязывающий фрагмент, и так далее) от приблизительно 2 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. Например, конечная

концентрация (вес/объем) составов может лежать в диапазоне приблизительно 2-200, 2-180, 2-160, 2-150, 2-120, 2-100, 2-80, 2-70, 2-60, 2-50, 2-40, 5-200, 5-180, 5-160, 5-150, 5-120, 5-100, 5-80, 5-70, 5-60, 5-50, 5-40, 10-200, 10-180, 10-160, 10-150, 10-120, 10-100, 10-80, 10-70, 10-60, 10-50, 10-40, 20-200, 20-180, 20-160, 20-150, 20-120, 20-100, 20-80, 20-70, 20-60, 20-50, 20-40, 30-200, 30-180, 30-160, 30-150, 30-120, 30-100, 30-80, 30-70, 30-60, 30-50, 30-40, 40-200, 40-180, 40-160, 40-150, 40-120, 40-100, 40-80, 40-70, 40-60, 40-50, 50-200, 50-180, 50-160, 50-150, 50-120, 50-100, 50-80, 50-70, 50-60, 60-200, 60-180, 60-160, 60-150, 60-120, 60-100, 60-80, 60-70, 70-200, 70-180, 70-160, 70-150, 70-120, 70-100, 70-80 мг/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления конечная концентрация биологического препарата в составе составляет приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 мг/мл.

[588] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно составляют с подходящими буферами. Подходящие буферы включают, но без ограничения, фосфатный буфер, лимонный буфер и гистидиновый буфер.

[589] Конечное значение pH состава обычно лежит между pH 5,0 и 8,0. Например, pH фармацевтической композиции может составлять приблизительно 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7 или 7,8.

[590] Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать поверхностно-активное вещество, такое как неионогенный детергент, одобренный для использования в фармацевтических составах. Такие поверхностно-активные вещества включают, например, полисорбаты, такие как полисорбат 20 (Tween™-20), полисорбат 80 (Tween™-80) и NP-40.

[591] Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать стабилизатор. Для жидких белковых препаратов стабильность может быть повышена за счет выбора pH-буферных солей, и часто также могут использоваться аминокислоты. Часто взаимодействие на границе жидкость/воздух или жидкость/твердое тело (с упаковкой) приводит к агрегации после адсорбции и развертыванию белка. Подходящие стабилизаторы включают, но без ограничения, сахарозу, мальтозу, сорбит, а также некоторые аминокислоты, такие как гистидин, глицин, метионин и аргинин.

[592] Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать одну или любую комбинацию следующих вспомогательных средств: фосфат натрия, аргинин, сахароза, хлорид натрия, трометамин, маннит, бензиловый спирт, гистидин, сахароза, полисорбат 80, цитрат натрия, глицин, полисорбат 20, трегалоза, полоксамер 188, метионин, трегалоза, р. ч. гиалуронидаза, сукцинат натрия, фосфат калия,

эдетат динатрия, хлорид натрия, хлорид калия, мальтоза, ацетат гистидина, сорбит, пентетовая кислота, человеческий сывороточный альбумин, пентетовая кислота.

[593] Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать консервант.

[594] Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению обычно представлена в виде жидкой или лиофилизированной формы. Обычно продукты могут быть представлены во флаконах (например, стеклянных флаконах). Продукты, доступные в шприцах, ручках или автоинжекторах, могут быть представлены в виде жидкостей, которыми предварительно заполнены эти системы упаковки/укупорки.

[595] В некоторых примерах фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, содержит липосомы, содержащие антитело, которое специфически связывает комплекс GARP-proTGFβ1, комплекс LTBP1-proTGFβ1, комплекс LTBP3-proTGFβ1 и комплекс LRRC33-proTGFβ1, которые могут быть получены любым подходящим способом, таким как описанный в документах 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 раскрыты в патенте США № 5013556. Особенно полезные липосомы могут быть получены способом обращенно-фазового испарения с липидной композицией, включающей фосфатидилхолин, холестерин и PEG-дериватизированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE). Липосомы пропускают через фильтры с определенным размером пор, чтобы получить липосомы желаемого диаметра.

[596] Согласно некоторым вариантам осуществления для предпочтительной доставки или локализации фармацевтической композиции в определенных тканях или типах клеток выбирают липосомы со свойствами нацеливания. Например, можно использовать определенные носители на основе наночастиц со свойствами нацеливания на костный мозг, например наночастицы или липосомы на основе липидов. Смотри, например, Sou (2012) “Advanced drug carriers targeting bone marrow”, публикация ResearchGate 232725109.

[597] Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут содержать адъювант или могут применяться в сочетании с ним. Предполагают, что определенный адъювант может усиливать иммунный ответ субъекта, например, на опухолевые антигены, и облегчать функцию Т-эффекторов, дифференцировку DC из моноцитов, усиленный захват и презентацию антигена APC и так далее. Подходящие адъюванты включают, но без ограничения, адъюванты на основе ретиноевой кислоты и их производные, адъюванты на

основе эмульсий масло-в-воде, такие как MF59 и другие сквален-содержащие адъюванты, лиганды Toll-подобного рецептора (TRL), α-токоферол (витамин E) и их производные.

[598] Антитела, описанные в настоящем документе, также могут быть заключены в микрокапсулы, полученные, например, с помощью методов коацервации или с помощью межфазной полимеризации, например гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметацилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. Примеры методов описаны ранее, смотри, например, в Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

[599] В других примерах фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, может быть составлена в формате с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, причем матрицы имеют форму формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, 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 молочная кислота-гликолевая кислота, такие как LUPRON DEPOT™ (микросферы для инъекций, состоящие из сополимера молочная кислота-гликолевая кислота и ацетата лейпролида), изобутират ацетата сахарозы и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

[600] Фармацевтические композиции, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко осуществить, например, путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны. Терапевтические композиции антител обычно помещают в контейнер со стерильным отверстием для доступа, например пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

[601] Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть в стандартных лекарственных 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.

[602] Подходящие поверхностно-активные средства включают, в частности, неионогенные 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 обычно содержат от 0,05 до 5% поверхностно-активного средства, может быть от 0,1 до 2,5%. Следует понимать, что при необходимости могут быть добавлены другие ингредиенты, например маннит или другие фармацевтически приемлемые носители.

[603] Подходящие эмульсии могут быть получены с использованием коммерчески доступных жировых эмульсий, таких как Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ и Lipiphysan™. Активный ингредиент или может быть растворен в предварительно смешанной эмульсионной композиции, или, альтернативно, он может быть растворен в масле (например, соевом масле, сафлоровом масле, хлопковом масле, кунжутном масле, кукурузном масле или миндальном масле), а эмульсия образуется при смешивании с фосфолипидом (например, яичными фосфолипидами, соевыми фосфолипидами или соевым лецитином) и водой. Следует понимать, что могут быть добавлены другие ингредиенты, например глицерин или глюкоза, для регулирования тоничности эмульсии. Подходящие эмульсии обычно содержат вплоть до 20% масла, например от 5 до 20%.

[604] Эмульсионные композиции могут быть получены путем смешивания антитела согласно настоящему изобретению с Intralipid™ или его компонентами (соевым маслом, яичными фосфолипидами, глицерином и водой).

Ингибирование активности TGFβ1

[605] Способы согласно настоящему изобретению включают способы ингибирования активности фактора роста TGFβ1 в одной или нескольких биологических системах. Такие способы могут предусматривать приведение одной или нескольких биологических систем в контакт с антителом и/или композицией согласно настоящему изобретению. В некоторых случаях эти способы предусматривают изменение уровня свободного фактора роста в биологической системе (например, в клеточной нише или у субъекта). Антитела и/или композиции в соответствии с такими способами могут включать, но без ограничения, биомолекулы, включая, но без ограничения, рекомбинантные белки, белковые комплексы и/или антитела или их антигенные части, описанные в настоящем документе.

[606] Согласно некоторым вариантам осуществления способы согласно настоящему изобретению можно применять для снижения или устранения активности фактора роста, они называются в настоящем документе «способами ингибирования». Некоторые такие способы могут предусматривать удержание зрелого фактора роста в комплексе TGFβ (например, TGFβ1 в комплексе с GARP, LTBP1, LTBP3 и/или LRRC33) и/или стимулирование повторной ассоциации фактора роста в комплекс TGFβ. В некоторых случаях способы ингибирования могут предусматривать применение раскрытого в

настоящем документе антитела. В соответствии с некоторыми способами ингибирования предлагается одно или несколько ингибирующих антител.

[607] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, их антигенсвязывающие части и композиции согласно настоящему изобретению можно применять для ингибирования активации TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе предлагается способ ингибирования активации TGFβ1, предусматривающий воздействие на комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1 антитела, его антигенсвязывающей части или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело, его антигенсвязывающая часть или фармацевтическая композиция ингибирует высвобождение зрелого TGFβ1 из комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и/или комплекса LRRC33-TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления способ осуществляют *in vitro*. Согласно некоторым вариантам осуществления способ осуществляют *in vivo*. Согласно некоторым вариантам осуществления способ осуществляют *ex vivo*.

[608] Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс GARP-TGFβ1 или комплекс LRRC33-TGFβ1 присутствует на внешней поверхности клетки.

[609] Согласно некоторым вариантам осуществления клетка, экспрессирующая комплекс GARP-TGFβ1 или комплекс LRRC33-TGFβ1, представляет собой фибробласт, миофибробласт, макрофаг, Т-клетку, моноцит, дендритную клетку, антигенпрезентирующую клетку, нейтрофил, супрессорную клетку миелоидного происхождения (MDSC), лимфоцит, тучную клетку или микроглиальную клетку. Миофибробласт может представлять собой фиброз-ассоциированный фибробласт (FAF) или рак-ассоциированный фибробласт (CAF). Т-клетка может представлять собой регуляторную Т-клетку (например, иммуносупрессивную Т-клетку). Нейтрофил может представлять собой активированный нейтрофил. Макрофаг может представлять собой резидентный макрофаг (например, клетку Купфера печени) или инфильтрирующий макрофаг. Макрофаг может представлять собой активированный (например, поляризованный) макрофаг, включая профибротические и/или опухолеассоциированные макрофаги (TAM), например макрофаги подтипа M2c и подтипа M2d. Согласно некоторым вариантам осуществления макрофаги подвергаются воздействию происходящих из опухоли факторов (например, цитокинов, факторов роста и так далее), которые могут дополнительно индуцировать пораковые фенотипы в макрофагах. Согласно некоторым

вариантам осуществления такой происходящий из опухоли фактор представляет собой CSF-1/M-CSF.

[610] Согласно некоторым вариантам осуществления клетка, экспрессирующая комплекс GARP-TGFβ1 или комплекс LRRC33-TGFβ1 представляет собой раковую клетку, например циркулирующие раковые клетки и опухолевые клетки.

[611] Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LTBP1-TGFβ1 или комплекс LTBP3-TGFβ1 связаны с внеклеточным матриксом (то есть, с компонентами ECM). Согласно некоторым вариантам осуществления внеклеточный матрикс содержит фибриллин и/или фибронектин. Согласно некоторым вариантам осуществления внеклеточный матрикс содержит белок, содержащий мотив RGD.

[612] LRRC33 экспрессируется в селективных типах клеток, в частности в клетках миелоидного происхождения, включая моноциты и макрофаги. Моноциты происходят от предшественников в костном мозге, циркулируют в кровотоке и достигают периферических тканей. Затем циркулирующие моноциты могут мигрировать в ткани, где они подвергаются воздействию локального окружения (например, ткань-специфичного, ассоциированного с заболеванием и так далее), которое содержит набор различных факторов, таких как цитокины и хемокины, вызывающих дифференцировку моноцитов в макрофаги, дендритные клетки и так далее. Сюда относятся, например, альвеолярные макрофаги в легких, остеокласты в костном мозге, микроглия в ЦНС, гистиоциты в соединительных тканях, клетки Купфера в печени и макрофаги бурой жировой ткани в бурой жировой ткани. В фиброзных тканях инфильтрированные миелоидные клетки могут включать фиброз-ассоциированные макрофаги (FAM), которые обычно представляют собой M2-подобные макрофаги, а также MDSC. В солидной опухоли инфильтрированные макрофаги могут представлять собой опухолеассоциированные макрофаги (TAM), опухолеассоциированные нейтрофилы (TAN) и супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) и так далее. Такие макрофаги могут активироваться и/или быть ассоциированы с активированными фибробластами, такими как карцинома-ассоциированные (или рак-ассоциированные) фибробласты (CAF), и/или стромой. Таким образом, ингибиторы активации TGFβ1, описанные в настоящем документе, которые ингибируют высвобождение зрелого TGFβ1 из LRRC33-содержащих комплексов, могут быть нацелены на любые из этих клеток, экспрессирующие LRRC33-proTGFβ1 на клеточной поверхности.

[613] Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LRRC33-TGFβ1 присутствует на внешней поверхности профибротических (M2-подобных) макрофагов. Согласно некоторым вариантам осуществления профибротические (M2-подобные)

макрофаги присутствуют в фиброзном микроокружении. Согласно некоторым вариантам осуществления нацеливание на комплекс LRRC33-TGFβ1 на внешней поверхности профибротических (M2-подобных) макрофагов обеспечивает лучший эффект по сравнению с нацеливанием только на комплексы LTBP1-TGFβ1 и/или LTBP1-TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления M2-подобные макрофаги дополнительно поляризованны на несколько подтипов с различными фенотипами, таких как TAM-подобные макрофаги M2c и M2d. Согласно некоторым вариантам осуществления макрофаги могут быть активированы различными факторами (например, факторами роста, хемокинами, цитокинами и ремоделирующими ECM молекулами), присутствующими в опухолевом микроокружении, включая, но без ограничения, TGFβ1, CCL2 (MCP-1), CCL22, SDF-1/CXCL12, M-CSF (CSF-1), IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, CXCR4, VEGF, PDGF, простагландин-регулирующие средства, такие как арахидоновая кислота и циклооксигеназа-2 (COX-2), родственный паратиреоидному гормону белок (PTHrP), RUNX2, HIF1α и металлопротеиназы. Воздействие одного или нескольких из таких факторов может дополнительно приводить моноциты/макрофаги к проопухолевому фенотипу. Если привести только один пример, было показано, что коэкспрессия CCL2 и VEGF в опухоли коррелирует с повышением уровня TAM и плохим диагнозом. В свою очередь, эти активированные опухолеассоциированные клетки могут также способствовать рекрутированию и/или дифференцировке других клеток в проопухолевые клетки, например CAF, TAN, MDSC и аналогичные клетки. Стромальные клетки могут также отвечать на активацию макрофагов и влиять на ремоделирование ECM и, в конечном счете, на васкуляризацию, инвазию и метастазирование. Например, CCL2 функционирует не только как аттрактант моноцитов, но также стимулирует клеточную адгезию, повышающе регулирующую MAC-1, который является рецептором ICAM-1, экспрессируемым в активированном эндотелии. Это может приводить к CCL2-зависимому артериогенезу и прогрессированию рака. Таким образом, ингибиторы TGFβ1, описанные в настоящем документе, можно применять в способе ингибирования артериогенеза путем вмешательства в сигнальную ось CCL2.

[614] Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1 связаны с внеклеточным матриксом. Согласно некоторым вариантам осуществления внеклеточный матрикс содержит фибриллин. Согласно некоторым вариантам осуществления внеклеточный матрикс содержит белок, содержащий мотив RGD.

[615] Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе предлагается способ снижения активации белка TGFβ1 у субъекта, предусматривающий

введение антитела, его антигенсвязывающей части или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, субъекту, тем самым снижая активацию белка TGFβ1 у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта есть фиброз или риск фиброза. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта есть рак или риск рака. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта есть деменция или риск деменции.

[616] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящем документе, снижают супрессивную активность регуляторных Т-клеток (Treg).

Клеточные анализы для измерения активации и/или ингибирующей активности TGFβ

[617] Активацию TGFβ (и ее ингибирование тестовым ингибитором TGFβ, таким как антитело) можно измерять с помощью любого подходящего способа, известного в данной области техники. Например, интегрин-опосредованную активацию TGFβ можно использовать в клеточном анализе, таком как анализ люциферазы «CAGA12», более подробно описанный в настоящем документе.

[618] Разработка новых контекстно-зависимых клеточных анализов активации TGFβ1 описана в предварительной заявке на патент США № 62/538476 и соответствующей публикации международной заявки № WO 2019/023661, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте. Предыдущие форматы анализа не могли различать активацию proTGFβ1, презентируемого эндогенными презентирующими молекулами, и активацию proTGFβ1, презентируемого экзогенными LTBP. Путем прямой трансфекции интегрин-экспрессирующих клеток новые анализы, раскрытые в публикации международной заявки № WO 2019/023661 и используемые в настоящем документе, устанавливают окно между активностью эндогенная презентирующая молекула-proTGFβ1 и активностью экзогенный LTBP-proTGFβ1.

[619] В отличие от комплексов GARP- или LRRC33-proTGFβ1, которые присутствуют на поверхности клеток, комплексы LTBP-proTGFβ1 встроены во внеклеточный матрикс. Таким образом, покрытие планшета для анализа является важным компонентом анализа при оценке активации proTGFβ1 в комплексе с LTBP (например, LTBP1/3). В связи с этим было показано, что фибронектин и фибриллин являются двумя компонентами ECM, которые, по-видимому, имеют решающее значение для ассоциации LTBP с матриксом и активации латентного TGFβ (Robertson *et al.*, *Matrix Biol.* 2015 Sep; 47:44-53). Например, включение LTBP3 в ECM, по-видимому, зависит от экспрессии

фибриллина в моделях как *in vitro*, так и *in vivo* (Zilberberg *et al.*, *J Cell Physiol.* 2012;227(12):3828–3836).

[620] С другой стороны, было показано, что LTBP1 взаимодействует с микрофибриллами фибриллина и фибронектином через их C- и N-концы соответственно (Dallas *et al.*, *J Biol Chem.* 2005;280(19):18871–18880; Fontana *et al.*, *FASEB J.* 2005;19(13):1798–1808; и Kantola *et al.*, *Exp Cell Res.* 2008;314(13):2488–2500). Более того, в отсутствие фибриллина LTBP1 все еще совместно локализуется с волокнами фибронектина (Robertson *et al.*, *Matrix Biol.* 2015 Sep; 47:44-53). Также было показано, что LTBP1 взаимодействует с ADAMTSL2 и 3 (Sengle *et al.*, *PloS Genet.* 2012;8(1):e1002425), IGFBP3 (Gui and Murphy, *Mol Cell Biochem.* 2003;250(1-2):189–195), фибулином-4 (Massam-Wu *et al.*, *J Cell Sci.* 2010 Sep 1;123(Pt 17):3006-18) и гепарином (Chen *et al.*, *J Biol Chem.* 2007;282(36):26418–26430).

[621] Помимо традиционных компонентов/белков ECM, тканевая трансглутаминаза (TG2) также может играть критическую роль в локализации TGFβ в ECM. Известно, что TG2 катализирует меж- и внутримолекулярные изопептидные связи, которые сшивают фибриллы ECM, эффективно повышая жесткость ECM и защищая ECM от протеолитической деградации (Benn *et al.*, *Current Opinion in Biomedical Engineering.*, 2019, https://doi.org/10,1016/j.cobme.2019,06,003). Более того, TG2 может сшивать LTBP1 с ECM, тем самым способствуя формированию матриксного резервуара TGFβ (Nunes *et al.*, *J Cell Biol.* 1997;136(5):1151–1163).

[622] Соответственно, N-конец LTBP может быть ковалентно связан с ECM посредством изопептидной связи, образование которой может катализироваться трансглутаминазами. Считается, что структурная целостность ECM важна для опосредования LTBP-ассоциированной активности TGFβ1. Например, жесткость матрикса может значительно влиять на активацию TGFβ1. Кроме того, включение фибронектина и/или фибриллина в каркас может значительно повышать LTBP-опосредованную активацию TGFβ1. Аналогично, присутствие фибронектина и/или фибриллина в анализах LTBP (например, анализах клеточной активности) может увеличивать окно анализа.

[623] Соответственно, клеточный анализ для измерения активации TGFβ1 может содержать следующие компоненты: i) источник TGFβ (рекомбинантного, эндогенного или трансфицированного); ii) источник активатора, такого как интегрин (рекомбинантный, эндогенный или трансфицированный); и iii) репортерную систему, которая реагирует на активацию TGFβ, такую как клетки, экспрессирующие рецепторы TGFβ, способные отвечать на TGFβ и переводить сигнал в считываемый результат (например, люциферазную активность в клетках CAGA12 или других линиях репортерных клеток). Согласно

некоторым вариантам осуществления репортерная клеточная линия содержит репортерный ген (например, ген люциферазы) под контролем TGFβ-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 такой промоторный элемент представляет собой элемент CAGA12. Репортерные клеточные линии, которые можно использовать в анализе, описаны, например, в документе Abe *et al.*, (1994) *Anal Biochem.* 216(2): 276-84, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам осуществления каждый из вышеупомянутых компонентов анализа получают из одного и того же источника (например, из одной и той же клетки). Согласно некоторым вариантам осуществления два из вышеупомянутых компонентов для анализа получают из одного и того же источника, а третий компонент анализа получают из другого источника. Согласно некоторым вариантам осуществления все три компонента анализа получают из различных источников. Например, согласно некоторым вариантам осуществления интегрин и латентный комплекс TGFβ (proTGFβ и презентирующая молекула) получают для анализа из одного и того же источника (например, из одной и той же линии трансфицированных клеток). Согласно некоторым вариантам осуществления интегрин и TGF получают для анализа из различных источников (например, из двух различных клеточных линий, из комбинации очищенного интегрина и трансфицированной клетки). Когда клетки используют в качестве источника одного или нескольких компонентов анализа, такие компоненты анализа могут быть эндогенными для клетки, стабильно экспрессируемыми в клетке, временно трансфицированными или любой комбинацией вышеперечисленного. Согласно некоторым вариантам осуществления анализ проводят в планшете или чашке для тканевых культур. Согласно некоторым вариантам осуществления планшет или чашка для тканевых культур покрыты компонентом внеклеточного матрикса (ECM). Согласно некоторым вариантам осуществления планшет или чашка для тканевых культур покрыты фибронектином и/или фибриллином. Согласно некоторым вариантам осуществления клеточный анализ дополнительно содержит четвертый компонент, содержащий источник TG2. Согласно некоторым вариантам осуществления TG2-компонент получают из того же источника, что и любой из вышеупомянутых компонентов, или из другого источника. Результаты неограничивающего примера варианта осуществления клеточного анализа для измерения активации TGFβ, демонстрирующие ингибирование комплекса LTBP1-proTGFβ1, комплекса LTBP3-proTGFβ1, комплекса GARP-proTGFβ1 или комплекса LRRC33-proTGFβ1, раскрыты в настоящем документе (смотри, например, пример 3).

[624] Специалист в данной области техники может легко адаптировать такие анализы к различным подходящим конфигурациям. Например, можно рассматривать различные источники TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления источник TGFβ представляет собой клетку, которая экспрессирует и депонирует TGFβ (например, первичную клетку, размноженную клетку, иммортализованную клетку или клеточную линию и так далее). Согласно некоторым вариантам осуществления источник TGFβ представляет собой очищенный и/или рекомбинантный TGFβ, иммобилизованный в системе анализа с помощью подходящих средств. Согласно некоторым вариантам осуществления TGFβ, иммобилизованный в системе анализа, присутствует внутри композиции внеклеточного матрикса (ECM) на планшете для анализа, с децеллюляризацией или без нее, что имитирует происходящий из фибробластов TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления TGFβ присутствует на клеточной поверхности клетки, используемой в анализе. Кроме того, в систему анализа может быть включена выбранная презентирующая молекула для получения подходящего латентного комплекса TGFβ. Рядовой специалист в данной области техники может легко определить, какая презентирующая молекула(ы) может присутствовать или экспрессироваться в определенных клетках или типах клеток. Используя такие системы анализа, можно легко измерять относительные изменения активации TGFβ в присутствии или в отсутствие тестируемого средства (такого как антитело) для оценки воздействия тестируемого средства на активацию TGFβ *in vitro*. Данные приведенных в качестве примера клеточных анализов представлены в разделе примеров ниже.

[625] Такие клеточные анализы можно модифицировать или адаптировать несколькими способами в зависимости от изучаемой изоформы TGFβ, типа латентного комплекса (например, презентирующей молекулы) и аналогичных факторов. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка, о которой известно, что она экспрессирует интегрин, способный активировать TGFβ, может быть использована в качестве источника интегрина в анализе. Такие клетки обычно включают клетки LN229. Другие подходящие клетки включают клетки SW480/β6 (например, клон 1E7). Согласно некоторым вариантам осуществления клеточная линия(ии) может быть модифицирована для снижения или устранения экспрессии одной или нескольких презентирующих молекул (например, посредством CRISPR-опосредованной абляции гена). Например, клеточная линия может представлять собой клеточную линию с нокаутом LTBP1 (например, CRISPR-опосредованная абляция гена путем нацеливания на экзон 7). Согласно другим вариантам осуществления клеточная линия может представлять собой клеточную линию с нокаутом LTBP3. Согласно другим вариантам осуществления клеточная линия может представлять

собой клеточную линию с нокаутом GARP. Согласно другим вариантам осуществления клеточная линия может представлять собой клеточную линию с нокаутом LRRC33.

[626] Согласно некоторым вариантам осуществления интегрин-экспрессирующие клетки могут быть котрансфицированы плазмидой, кодирующей представляющую интерес презентирующую молекулу (такую как GARP, LRRC33, LTBP (например, LTBP1 или LTBP3) и так далее), и плазмидой, кодирующей представляющую интерес проформу изоформы TGFβ (такую как proTGFβ1). После трансфекции клетки инкубируют в течение времени, достаточного для экспрессии трансфицированных генов (например, приблизительно 24 часа), клетки промывают и инкубируют с последовательными разведениями тестируемого средства (например, антитела). Затем в систему анализа добавляют репортерную клеточную линию (например, клетки CAGA12) с последующим инкубированием в течение соответствующего времени для обеспечения TGFβ-сигнализации. После периода инкубации (например, приблизительно 18-20 часов) после добавления тестируемого средства детектируют сигнал/показание (например, люциферазную активность) с помощью подходящих средств (например, для экспрессирующей люциферазу репортерной клеточной линии можно использовать реагент Bright-Glo™ (Promega®)). Согласно некоторым вариантам осуществления флуоресценцию люциферазы можно детектировать с использованием планшетного ридера BioTek® (Synergy™ H1) с настройками автоматического усиления.

[627] Данные демонстрируют, что приведенные в качестве примера антитела согласно настоящему изобретению способны селективно ингибировать активацию TGFβ1 (смотри, например, пример 3 и таблицу 15).

Нуклеиновые кислоты

[628] Согласно некоторым вариантам осуществления, антитела, их антигенсвязывающие части и/или композиции согласно настоящему изобретению могут кодироваться молекулами нуклеиновой кислоты. Такие молекулы нуклеиновой кислоты включают без ограничения молекулы ДНК, молекулы РНК, полинуклеотиды, олигонуклеотиды, молекулы иРНК, векторы, плазмиды и аналогичные структуры. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие может относится к клеткам, запрограммированным или созданным для экспрессии молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих соединения и/или композиции согласно настоящему изобретению. В некоторых случаях нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению включают кодон-оптимизированные нуклеиновые кислоты. Способы создания кодон-оптимизированных нуклеиновых кислот известны в данной области техники и могут включать, но без ограничения, описанные в патентах США №№ 5786464 и 6114148,

содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

[629] Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующими примерами, которые никоим образом не предназначены для ограничения. Полное содержание всех ссылок, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых на всем протяжении этой заявки, а также фигур, настоящим включено в настоящий документ посредством ссылки.

Наборы для применения в облегчении заболеваний/нарушений, ассоциированных со связанным с TGFβ1 показанием

[630] Настоящее изобретение также относится к наборам для применения в облегчении заболеваний/нарушений, ассоциированных со связанным с TGFβ1 показанием. Такие наборы могут содержать один или несколько контейнеров, содержащих антитело или его антигенсвязывающую часть, как описано в настоящем документе.

[631] 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 для лечения, отсрочки начала или облегчения целевого заболевания, как описано в настоящем документе. Набор может дополнительно содержать описание выбора индивидуума, подходящего для лечения, на основе определения наличия у этого индивидуума целевого заболевания. Согласно другим вариантам осуществления инструкции содержат описание введения антитела или его антигенсвязывающей части индивидууму с риском целевого заболевания.

[632] Инструкции, относящиеся к применению антител или их антигенсвязывающих частей, обычно включают информацию о дозировке, графике дозирования и способе введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут представлять собой стандартные дозы, объемные упаковки (например, многодозовые упаковки) или части стандартных доз. Инструкции, поставляемые в наборах согласно настоящему изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или вкладыше в упаковку (например, листе бумаги, вложенном в набор), но также приемлемы машиночитаемые инструкции (например, инструкции на магнитном или оптическом диске).

[633] На этикетке или вкладыше в упаковку указывают, что композиция используется для лечения, отсрочки начала и/или облегчения заболевания или нарушения, ассоциированного со связанным с TGFβ1 показанием. Могут быть предоставлены инструкции для применения любого из способов, описанных в настоящем документе.

[634] Наборы согласно настоящему изобретению находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, но без ограничения, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и аналогичные сосуды. Также рассматриваются упаковки для использования в сочетании с конкретным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения (например, распылитель) или устройство для инфузии, такое как мининасос. Набор может содержать стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). Контейнер может также содержать стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет 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, как описано в настоящем документе.

[635] Наборы могут, необязательно, содержать дополнительные компоненты, такие как буферы и информацию для интерпретации. Обычно набор содержит контейнер и этикетку или вкладыш(и) в упаковку на контейнере или в соединении с ним. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к готовым изделиям, содержащим содержимое наборов, описанных выше.

Примеры

Пример 1: Методология скрининга и отбора антител

[636] Антигенсвязывающие фрагменты подвергали скринингу из библиотек с использованием очищенных рекомбинантных белково-антигенных комплексов на стадиях положительного отбора и отрицательного отбора. Антигены для положительного отбора включали все 4 человеческих LLC и все 4 мышиных LLC, каждый с человеческим proTGFβ1. Антигены для отрицательного отбора включали зрелые факторы роста (то есть человеческие TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3). После идентификации с помощью Octet специфичных и селективных связывающих веществ их превращали в полноразмерные IgG для для дальнейшей оценки. Из идентифицированных высокоаффинных связывающих веществ отбирали вещества с низкой скоростью распада.

[637] Из 16 новых антител, которые демонстрировали улучшенные скорость диссоциации (более низкую K_{OFF}) и ингибирующее действие при измерении с помощью анализов клеточной активности, для дальнейшей оценки отобрали три антитела, а именно Ab42, Ab46 и Ab50.

[638] Специфическое и селективное связывание Ab42, Ab46 и Ab50 подтверждали с помощью ELISA (фиг. 3 и 4). В качестве положительного контроля использовали Ab2, поскольку ранее было продемонстрировано, что Ab2 является селективным связывающим веществом и ингибитором TGFβ1, как показано на фиг. 1. Изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ3 использовали в качестве отрицательного контроля, чтобы продемонстрировать изоформную селективность новых антител.

[639] Кинетику связывания *in vitro* (скорость образования/распада) измеряли с помощью анализов на основе Biacore, и определяли аффинность в отношении всех четырех известных LLC, используя как человеческие, так и мышиные аналоги для каждого. На основе скорости ассоциации и скорости диссоциации для каждого рассчитывали K_D. Кроме того, относительную аффинность по сравнению с эталонным антителом в качестве точки сравнения рассчитывали и выражали как «кратную разницу» относительно эталонного антитела.

Пример 2. Профили связывания/кинетики in vitro

1) Анализы связывания на основе BLI

[640] Аффинности Ab1, Ab2 и Ab3 измеряли с помощью анализа OCTET® на человеческих клетках proTGFβ1, тогда как активность измеряли с помощью репортерных клеток CAGA12, тестируя ингибирование человеческого proTGFβ1. Протокол, используемый для измерения аффинности антител к комплексам, предлагаемым в настоящем документе, представлен в таблице 14 ниже, а сводный список профилей аффинности примеров антител согласно настоящему изобретению представлен в таблице 6 в настоящем документе.

Таблица 21: Протокол проведения анализа связывания Octet

Материалы: - 96-луночные черные полипропиленовые планшеты - Покрытые стрептавидином наконечники для Octet - 10х кинетический буфер (разведенный 1:10 в ФСБ)
1. Замачивание необходимого количества наконечников со стрептавидином в 1X кинетическом буфере; помещение в аппарат для приведения в равновесие
2. Заполнение планшета для образцов: - 200 мкл буфера или разведения антитела в каждую лунку a. Столбец 1 – исходный уровень (буфер) b. Столбец 2 – биотинилированный белок (например, sGARP-proTGFβ1 или LTBP1-proTGFβ1); разведенный до 5 мкг/мл

c. Столбец 3 - исходный уровень 2 (буфер) d. Столбец 4 - ассоциация антитела с Ab e. Столбец 5 - ассоциация антитела с Ab f. Столбец 6 - диссоциация Ab (буфер) g. Столбец 7 - диссоциация Ab (буфер)
3. Разведения в 96-луночном планшете: a. Разведение обоих антител до 50 мкг/мл в 300 мкл 1x буфера в ряду A b. Добавление 200 мкл буфера к остальной части каждого столбца c. Перенос 100 мкл ниже по столбцу, чтобы получить 3-кратные разведения
4. Помещение планшета для образцов в аппарат рядом с планшетом для наконечников
5. Настройка программного обеспечения a. Указание буфера, нагрузки, образца (один анализ на тестируемое антитело) b. Указание для стадий протокола (исходный уровень, загрузка, ассоциация, диссоциация) заданной продолжительности: - Исходный уровень: 60 секунд - Загрузка: 300 секунд - Исходный уровень 2: 60 секунд - Ассоциация: 300 секунд - Диссоциация: 600 секунд
6. Анализ данных a. Вычитание исходного уровня из эталонной ячейки b. Установка нормализации по последним пяти секундам исходного уровня c. Выравнивание по диссоциации d. Анализ ассоциации и диссоциации (модель связывания 1:1, подбор кривых) e. Определение наилучших значений R^2; включение концентраций с наилучшими значениями R^2 f. Выбор глобального приближения g. Установка цветов образцов по типу датчика h. Анализ i. Сохранение таблицы и экспорт

2) Анализы связывания на основе SET

[641] Аффинность Ab2, Ab3, Ab11, Ab12, Ab19, Ab20, и Ab35, C1 и C2 также измеряли с помощью титрования при равновесии в растворе (SET) на Meso-Scale Discovery (MSD). MSD-SET является хорошо известным методом, который можно применять для

определения равновесной K_D в жидкой фазе. Анализы равновесия на основе растворов, такие как MSD-SET, основаны на принципе кинетического исключения, в котором для определения аффинности измеряют связывание свободного лиганда в равновесии, а не скорости ассоциации и диссоциации в реальном времени.

В кратком изложении, стандартные планшеты для MSD покрывали раствором 20 нМ представляющего интерес моноклонального антитела (захватывающее антитело) в течение 30 минут при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C. Затем на отдельном несвязывающем 96-луночном планшете то же самое моноклональное антитело, используемое в качестве захватывающего антитела, титровали, доводя концентрации от мкМ до фМ, и инкубировали с одной установленной концентрацией биотинилированного антигена в течение ночи при комнатной температуре без встряхивания. После 20-24 часов уравновешивания планшет с захватывающим антителом блокировали и промывали перед добавлением на планшет уравновешенных растворов образцов антитело-антиген ровно на 150 секунд. Затем планшет промывали перед добавлением вторичного реагента стрептавидин-сульфотаг в течение 3 минут. Планшеты промывали перед считыванием в буфере для считывания MSD с использованием MESO® QuickPlex SQ 120. Профили аффинности по MSD-SET, как описано выше, представлены в **таблице 7** в настоящем документе.

3) Анализы на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

[642] Систему BIACORE® использовали для определения аффинности моновалентного связывания и кинетических параметров связывания антигена тестируемыми антителами. Кинетику связывания оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием Biacore 8K (GE Healthcare). Для захвата биотинилированных антигенов использовали сенсорный чип Biotin CAP. Fab в различных концентрациях (0 нМ, 0,62 нМ, 1,25 нМ, 2,5 нМ, 5 нМ и 10 нМ) вводили поверх захваченных антигенов. Использовали кинетику нескольких циклов, когда каждую концентрацию аналита вводили в отдельном цикле и поверхность сенсорного чипа регенерировали после каждого цикла. Все анализы проводили в свежеприготовленном буфере 1x HBS-EP+ (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% Tween20, pH 7,4). Данные для всех концентраций аналита для каждого взаимодействия глобально согласовывали с моделью связывания 1:1 для получения кинетических параметров. В качестве эталона использовали сенсорограмму для концентрации аналита 0 нМ.

[643] Кинетику связывания для взаимодействий антител с каждым из антигенных комплексов человеческий LTBP1-ProTGFb1, человеческий LTBP3-ProTGFb1, человеческий GARP-ProTGFb1 и человеческий LRRC33-ProTGFb1 оценивали с помощью

поверхностного плазмонного резонанса. Кинетику связывания оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием аппарата BIACORE® 8K (GE). Биотинилированные антигены захватывали на чипе Biotin CAP, и Fab-фрагменты антител использовали в качестве аналитов. Сенсорограммы для связывания Fab в различных концентрациях (0,6 – 10 нМ) глобально согласовывали для получения кинетических параметров.

[644] Кинетику связывания для Fab оценивали в отношении каждого из четырех человеческих антигенов, LTBP1-ProTGFb1, LTBP3-ProTGFb1, GARP-ProTGFb1 и LRRC33-ProTGFb1. Данные собирали при концентрациях Fab 0,62 нМ, 1,25 нМ, 2,5 нМ, 5 нМ и 10 нМ и глобально согласовывали с моделью связывания 1:1 для получения кинетических параметров и аффинности связывания для каждого взаимодействия. Эти эксперименты повторяли.

[645] На фиг. 2 представлен репрезентативный набор данных, демонстрирующий заметно улучшенную скорость распада Ab46 по сравнению с эталонным антителом, используемым в качестве точки сравнения, которое также является ингибитором активации TGFβ1. Два антитела в форме Fab демонстрируют схожую кинетику ассоциации, но Ab46 остается связанным с антигеном более чем в 50 раз дольше, чем эталонное антитело.

Таблица 22: Кинетика связывания Fab по Biacore

Антиген	**Fab**	**k_{on} (1/мс)**	**k_{off} (1/с)**	**K_D (нМ)**
hLTBP1-proTGFβ1	Эталон-1	4,25e+6	1,04e-2	2,44
	Эталон-2	1,74e+6	4,78e-3	2,76
	Ab46	2,44e+6	8,52e-5	0,035
hLTBP3-proTGFβ1	Эталон-1	3,14e+6	9,09e-3	2,90
	Эталон-2	1,36e+6	4,64e-3	3,42
	Ab46	1,78e+6	1,95e-4	0,109
hGARP-proTGFβ1	Эталон-1	4,41e+6	1,43e-2	3,25
	Эталон-2	1,52e+6	4,08e-3	2,67
	Ab46	1,89e+6	3,59e-4	0,190
hLRRC33-proTGFβ1	Эталон-1	2,50e+6	1,33e-2	5,3
	Эталон-2	1,52e+6	6,38e-3	4,20
	Ab46	1,36e+6	1,62e-4	0,119

Пример 3: Функциональные анализы для детектирования ингибирования активированного рекомбинантного латентного TGFβ1

[646] Разработка новых контекстно-зависимых клеточных анализов активации TGFβ1 описана в предварительной заявке на патент США № 62/538476, включенной в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте. Предыдущие форматы анализа не могли различать активацию proTGFβ1, презентируемого эндогенными презентирующими молекулами, и активацию proTGFβ1, презентируемого экзогенными LTBP. Путем прямой трансфекции интегрин-экспрессирующих клеток новые анализы, раскрытые в предварительной заявке на патент США № 62/538476 и используемые в настоящем документе, устанавливают окно между активностью эндогенная презентирующая молекула-proTGFβ1 и активностью экзогенный LTBP-proTGFβ1. Поскольку комплексы LTBP-proTGFβ1 встроены во внеклеточный матрикс, покрытие планшета для анализа также является важным компонентом анализа. Использование планшетов для тканевых культур, покрытых белком ECM фибронектином, сделало анализы LTBP более надежными.

[647] Чтобы определить, являются ли какие-либо изоформно-специфичные антитела, описанные в настоящем документе, функциональными, были разработаны клеточные анализы активации интегрином αVβ большого латентного комплекса (LLC) TGFβ1, которые специфичны для каждой известной презентирующей молекулы: LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33. В процессе разработки и оптимизации анализа было установлено, что фибронектин является критическим белком ECM для интегрин-зависимой активации LLC TGFβ1, презентируемых LTBP, *in vitro*.

Анализ I. Активация латентного TGFβ1, депонированного в ECM

[648] Для анализов клеточной активности был разработан следующий протокол. Этот анализ оптимален для активации во внеклеточном матриксе (при презентации LTBP) клетками с интегринами.

[649] Материалы:

- Клетки MvLu1-CAGA12 (клон 4A4)

- Клетки SW480/β6 (клон 1E7) (субъединица αV эндогенно экспрессируется на высоких уровнях; субъединица β6 стабильно сверхэкспрессируется)

- Клеточная линия LN229 (высокие уровни эндогенного интегрина αVβ8) ATCC® CRL-2611™

- Обработанный для ТС 96-луночный планшет для анализа с белыми стенками Costar #3903

- Белый 96-луночный планшет для анализа с высоким связыванием Greiner Bio-One® μclear #655094

- Фибронектин человека (Corning® #354008)

- Многоканальная пипетка P200

- Пипетки P20, P200 и P1000 со стерильными наконечниками с фильтром для каждой

- Стерильные микроцентрифужные пробирки и штатив

- Стерильные резервуары для реагентов

- 0,4% трипановый синий

- Стерильные пипетки 2 мл, 5 мл, 10 мл и 25 мл

- Обработанные для тканевых культур планшеты100 мм или 150 мм

- 70% этанол

- Среда Opti-MEM с уменьшенным содержанием сыворотки (Life Tech #31985-070)

- Lipofectamine® 3000 (Life Tech #L3000015)

- Реагент для анализа люциферазы Bright-Glo™ (Promega® #E2620)

- 0,25% триспин + 0,53 мМ ЭДТА

- Плазммида для экспрессии proTGFβ1 человека

- Плазммида для экспрессии LTBP1S человека

- Плазммида для экспрессии LTBP3 человека

- Плазммида для экспрессии LRRC32 (GARP) человека

- Плазммида для экспрессии LRRC33 человека

[650] Оборудование:

- Планшетный ридер BioTek Synergy H1

- Бокс для ТС

- Настольная центрифуга

- CO_2 инкубатор 37°C 5% CO2

- Водяная/шариковая баня 37°C

- Встряхиватель с платформой

- Микроскоп

- Гемоцитометр/счетчик

[651] Определения:

- Клетки CAGA12 4A4: Производные клеток MvLu1 (эпителиальные клетки легких норки), стабильно трансфицированные синтетическим промотором CAGA12, управляющим экспрессией гена люциферазы

- DMEM-0,1% BSA: Среда для анализа; базовой средой является DMEM (Gibco Cat# 11995-065), среда также содержит BSA, разведенный до 0,1% вес./об., пенициллин/стрептиномицин и 4 мМ глутамина

- D10: DMEM 10% FBS, P/S, 4 мМ глутамина, 1% NEAA, 1X GlutaMAX (Gibco Cat# 35050061)

- Среда SW480/β6: D10 + 1000 мкг/мл G-418

- Среда CAGA12 (4A4): D10 + 0,75 мкг/мл пуромицина

[652] Процедура:

[653] В день 0 клетки высевали для трансфекции. Клетки SW480/β6 (клон 1E7) отделяли с помощью трипсина и осаждали (вращение 5 мин. при 200×g). Клеточный осадок ресуспендировали в среде D10 и подсчитывали количество жизнеспособных клеток на мл. Клетки высевали по $5{,}0\times10^6$ клеток на 12 мл на чашку для культивирования объемом 100 мм. Для клеток CAGA12 клетки пересевали при плотности 1,0 миллиона на колбу T75 для использования в анализе в день 3. Культуры инкубировали при 37°C и 5% CO_2.

[654] В день 1 интегрин-экспрессирующие клетки трансфицировали. Следовали протоколу производителя по трансфекции реагентом Lipofectamine® 3000. Следующие вещества разводили в Opti-MEM™ I по 125 мкл на лунку: 7,5 мкг ДНК (презентирующая молекула) + 7,5 мкг ДНК (proTGFβ1), 30 мкл P3000 и OptiMEM I вплоть до 125 мкл. Лунку перемешивали с помощью пипетирования ДНК, затем добавляли Opti-MEM™. Добавляли P3000 и все хорошо перемешивали с помощью пипетирования. Готовили мастер-микс Lipofectamine® 3000 для добавления к смесям ДНК: для анализа LTBP1: 15 мкл Lipofectamine® 3000, вплоть до 125 мкл OptiMEM I на лунку; для анализа LTBP3: 45 мкл Lipofectamine® 3000, вплоть до 125 мкл Opti-MEM™ I на лунку. Разведенный Lipofectamine® 3000 добавляли к ДНК, хорошо перемешивали с помощью пипетирования и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. После инкубации раствор перемешивали несколько раз с помощью пипетирования, и затем по каплям добавляли 250 мкл ДНК:Lipofectamine® 3000 (2×125 мкл) на чашку. Каждую чашку осторожно встряхивали для перемешивания, и возвращали чашку в инкубатор для тканевых культур на ~ 24 часа.

[655] В дни 1-2 планшеты для анализа покрывали человеческим фибронектином. В частности, лиофилизированный фибронектин разводили до 1 мг/мл в ультрачистой дистиллированной воде (стерильной). 1 мг/мл исходного раствора разводили до 19,2 мкг/мл в ФСБ (стерильном). Добавляли по 50 мкл на лунку в планшет для анализа (с высоким связыванием) и инкубировали в течение ночи в инкубаторе для тканевых культур (37°C и 5% CO_2). Конечная концентрация составляла 3,0 мкг/см^2.

[656] В день 2 трансфицированные клетки высевали для анализа и добавления ингибитора. Сначала фибронектиновое покрытие промывали, добавляя по 200 мкл ФСБ на лунку к раствору фибронектина, уже находящемуся в планшете для анализа. Вручную удаляли жидкость с помощью многоканальной пипетки. Промывание повторяли, всего два промывания. Планшету давали высохнуть при комнатной температуре без крышки перед добавлением клеток. Затем клетки высевали путем отделения с помощью трипсина и осаждения (вращение 5 мин. при 200×g). Осадок ресуспендировали в среде для анализа и подсчитывали количество жизнеспособных клеток на мл. Для анализа LTBP1 клетки разводили до $0{,}10\times10^6$ клеток на мл и высевали по 50 мкл на лунку (5000 клеток на лунку). Для анализа LTBP3 клетки разводили до $0{,}05\times10^6$ клеток на мл и высевали по 50 мкл на лунку (2500 клеток на лунку). Для получения разведений функциональных антител антитела предварительно разводили до постоянной рабочей концентрации в носителе. Исходные антитела последовательно разводили в носителе (оптимальным является ФСБ, цитратно-натриевый буфер не годится). Каждую точку последовательного разведения разводили в среде для анализа до четырехкратной конечной концентрации антитела. Добавляли по 25 мкл на лунку антитела в четырехкратной концентрации и инкубировали культуры при 37°C и 5% CO_2 в течение ~ 24 часов.

[657] В день 3 добавляли TGFβ-репортерные клетки. Клетки CAGA12 (клон 4A4) для анализа отделяли с помощью трипсина и осаждали (вращение 5 мин. при 200×g). Осадок ресуспендировали в среде для анализа и подсчитывали количество жизнеспособных клеток на мл. Клетки разводили до $0{,}4\times10^6$ клеток на мл и высевали по 50 мкл на лунку (20000 клеток на лунку). Клетки возвращали в инкубатор.

[658] В день 4 считывали результаты анализа (через 16-20 часов после добавления антител и/или репортерных клеток). Реагенту Bright-Glo™ и тестируемому планшету давали перед считыванием принять комнатную температуру. Настройки считывания на Bio-Tek® Synergy™ H1 устанавливали с использованием протокола TMLC_std – этот способ имеет настройку автоматического усиления. Выбирали лунки положительного контроля для автомасштабирования (высокий уровень). Добавляли по 100 мкл реагента Bright-Glo на лунку. Инкубировали в течение 2 мин. со встряхиванием при комнатной температуре, защищая планшет от света. Планшет считывали на BioTek Synergy H1.

[659] Для анализа, изображенного на **фиг. 27**, был разработан следующий протокол. Этот анализ или протокол «прямой трансфекции» оптимален для активации презентируемого на клеточной поверхности TGFβ1 (презентирующая молекула GARP или LRRC33) клетками с интегринами.

[660] Материалы:

- Клетки MvLu1-CAGA12 (клон 4A4)

- Клетки SW480/β6 (клон 1E7) (субъединица αV эндогенно экспрессируется на высоких уровнях; субъединица β6 стабильно сверхэкспрессируется)

- Клеточная линия LN229 (высокие уровни эндогенного интегрина αVβ8)

- Обработанный для ТС 96-луночный планшет для анализа с белыми стенками Costar #3903

- Белый 96-луночный планшет для анализа с высоким связыванием Greiner Bio-One® μclear #655094

- Фибронектин человека (Corning #354008) Многоканальная пипетка P200

- Пипетки P20, P200 и P1000 со стерильными наконечниками с фильтром для каждой

- Стерильные микроцентрифужные пробирки и штатив

- Стерильные резервуары для реагентов

- 0,4% трипановый синий

- Стерильные пипетки 2 мл, 5 мл, 10 мл и 25 мл

- Обработанные для тканевых культур планшеты100 мм или 150 мм

- 70% этанол

- Среда Opti-MEM® с уменьшенным содержанием сыворотки (Life Tech #31985-070)

- Lipofectamine® 3000 (Life Tech #L3000015)

- Реагент для анализа люциферазы Bright-Glo™ (Promega® #E2620)

- 0,25% триспин + 0,53 мМ ЭДТА

- Плазммида для экспрессии proTGFβ1 человека

- Плазммида для экспрессии LTBP1S человека

- Плазммида для экспрессии LTBP3 человека

- Плазммида для экспрессии LRRC32 (GARP) человека

- Плазммида для экспрессии LRRC33 человека

Оборудование:

- Планшетный ридер Bio-Tek® Synergy™ H1

- Бокс для тканевых культур

- Настольная центрифуга

- CO_2 инкубатор 37°C 5% CO_2

- Водяная/шариковая баня 37°C

- Встряхиватель с платформой

- Микроскоп

- Гемоцитометр/счетчик

[661] Определения:

- Клетки CAGA12 4A4: Производные клеток MvLu1 (эпителиальные клетки легких норки), стабильно трансфицированные синтетическим промотором CAGA12, управляющим экспрессией гена люциферазы

- DMEM-0,1% BSA: Среда для анализа; базовой средой является DMEM (Gibco Cat# 11995-065), среда также содержит BSA, разведенный до 0,1% вес./об., пенициллин/стрептиномицин и 4 мМ глутамина

- D10: DMEM 10% FBS, P/S, 4 мМ глутамина, 1% NEAA, 1X GlutaMAX (Gibco Cat# 35050061)

- Среда SW480/β6: D10 + 1000 мкг/мл G-418

- Среда CAGA12 (4A4): D10 + 0,75 мкг/мл пуромицина

[662] Способы:

[663] В день 0 экспрессирующие интегрин клетки высевали для трансфекции. Клетки отделяли с помощью трипсина и осаждали (вращение 5 мин. при 200×g). Клеточный осадок ресуспендировали в среде D10 и подсчитывали количество жизнеспособных клеток на мл. Клетки разводили до $0,1\times10^6$ клеток на мл и высевали по 100 мкл на лунку (10000 клеток на лунку) в планшет для анализа. Для клеток CAGA12 пересевали при плотности 1,5 миллиона на колбу T75 для использования в анализе в день 2. Культуры инкубировали при 37°C и 5% CO_2.

[664] В день 1 клетки трансфицировали. Следовали протоколу производителя по трансфекции реагентом Lipofectamine® 3000. Следующие вещества разводили в OptiMEM® I по 5 мкл на лунку: 0,1 мкг ДНК (презентирующая молекула) + 0,1 мкг ДНК (proTGFβ1), 0,4 мкл P3000 и OptiMEM I вплоть до 5 мкл. Лунку перемешивали с помощью пипетирования ДНК, затем добавляли OptiMEM®. Добавляли P3000 и все хорошо перемешивали с помощью пипетирования. Готовили мастер-микс с Lipofectamine® 3000 для добавления к смесям ДНК: 0,2 мкл Lipofectamine® 3000, вплоть до 5 мкл OptiMEM I на лунку. Разведенный Lipofectamine® 3000 добавляли к ДНК, хорошо перемешивали с помощью пипетирования и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. После инкубации раствор перемешивали несколько раз с помощью пипетирования, и затем добавляли по 10 мкл ДНК:Lipofectamine® 3000 (2×5 мкл) на лунку. Планшет для клеток возвращали в инкубатор для тканевых культур на ~ 24 часа.

[665] В день 2 добавляли антитело и TGFβ-репортерные клетки. Для получения разведений функциональных антител исходное антитело последовательно разводили в носителе (оптимальным является ФСБ). Затем каждую точку разводили в среде для анализа до двукратной конечной концентрации антитела. После получения антител планшет для клеток дважды промывали средой для анализа путем отсасывания (вакуумным

аспиратором) с последующим добавлением среды для анализа по 100 мкл на лунку. После второго промывания среду для анализа заменяли на антитело в двукратной концентрации по 50 мкл на лунку. Планшет для клеток возвращали в инкубатор на ~ 15-20 мин.

[666] Для получения клеток CAGA12 (клон 4A4) для анализа клетки отделяли с помощью трипсина и осаждали (вращение 5 мин. при 200×g). Осадок ресуспендировали в среде для анализа и подсчитывали количество жизнеспособных клеток на мл. Клетки разводили до $0,3\times10^6$ клеток на мл и высевали по 50 мкл на лунку (15000 клеток на лунку). Клетки возвращали в инкубатор.

[667] В день 3 считывали результаты анализа приблизительно через 16-20 часов после добавления антител и/или репортерных клеток. Системе для анализа люциферазы Bright-Glo™ (Promega®) и тестируемому планшету давали перед считыванием принять комнатную температуру. Настройки считывания на Bio-Tek® Synergy™ H1 устанавливали на использование протокола TMLC_std – этот способ имеет настройку автоматического усиления. Лунки положительного контроля устанавливали для автомасштабирования (высокий уровень). Добавляли по 100 мкл реагента Bright-Glo на лунку. Инкубировали в течение 2 мин. со встряхиванием при комнатной температуре, защищая планшет от света. Планшет считывали на Bio-Tek® Synergy™ H1.

[668] Для расчета значений IC50 необработанные значения люминесценции нормализовывали по лункам, обработанным только ФСБ (носителем). Нормализованные значения наносили на график с использованием программного обеспечения PRISM®, и рассчитывали значения с использованием 3-точечной нелинейной регрессии.

[669] В **таблица 23** приведены рассчитанные значения IC50 для изоформно-специфичных антител. Приведенные значения IC50 усреднены для дублирующих лунок в одном эксперименте по определению зависимости доза-ответ; кривые доза-ответ и значения IC50 представляют несколько независимых экспериментов.

Таблица 23: IC50 для изоформно-специфичных антител против комплексов proTGFβ1-презентирующая молекула, измеренные с помощью анализа активности in vitro

Ab	**IC50 (нМ)**			
	hLTBP1-proTGFβ1	**hLTBP3-proTGFβ1**	**hGARP-proTGFβ1**	**hLRRC33-proTGFβ1**
Ab3	24,29	10,42	0,981	0,8578
Ab11	2,954	1,562	0,7902	1,268
Ab12	3,794	1,555	1,077	2,434
Ab2	*3,394*	*0,8673*	*0,7758*	*1,375*

Ab19	1,656	1,599	1,34	0,4014
Ab20	1,851	1,184	0,3872	1,354
Ab35	6,246	2,707	3,715	5,37
Ab1	14,47	2,707	3,715	5,37

Пример 4. Ингибирование острого фиброза антителами к proTGFβ1 в модели острого фиброза почек, вызываемого односторонней обструкцией мочеточника (UUO)

[670] Ингибирование острого фиброза антителами против TGFβ1 тестировали на модели острого фиброза почек, вызываемого односторонней обструкцией мочеточника (UUO). В этой модели фиброз индуцируют у самцов мышей путем перманентной хирургической перевязки левого мочеточника в день исследования 0. В качестве здорового контроля в эти эксперименты включали мышей с мнимой операцией, которые подвергались хирургическому вмешательству, но их мочеточники не были перекрыты.

[671] Контрольные или тестируемые антитела (Ab3, Ab2) вводили мышам путем интраперитонеальной (и/п) инъекции в дни исследования -1 и 4. В конце исследования в день 5 после хирургического вмешательства брали почки, и из этих тканей получали РНК. Затем оценивали степень индукции фиброза с помощью количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) для панели генов, ассоциированных с фиброзом, включая коллаген I (*Col1a1*), коллаген III (*Col3a1*), фибронектин 1 (*Fn1*), лизилоксидазу (*Lox*), лизилоксидазоподобный белок 2 (*Loxl2*), гладкомышечный актин (*Acta2*), матриксную металлопротеазу (*Mmp2*) и интегрин альфа 11 (*Itga11*) (Rolfe *et al.*, 2007. *Sound Repair Regen.* 15(6): 897-906) (Tamaki *et al.*, 1994. *Kidney Int.* 45(2): 525-536) (Bansal *et al.*, 2017. *Exp Mol Med.* 49(11): e396) (Leaf & Duffield, 2016. *J Clin Invest.* 127(1): 321-334).

[672] Воздействие получения Ab2 или Ab3 на экспрессию коллагеновых генов

[673] *Col1a1* и *Col3a1* являются ключевыми факторами фиброза. Как показано на **фиг. 5A**, *Col1a1* индуцируется 10-40-кратно в почках с обструкцией, а *Col3a1* повышающе регулируется 5-25-кратно ($P<0,005$, сравнение мышей с мнимой операцией + IgG с группой UUO + IgG). Мыши UUO, получавшие 3, 10 или 30 мг/кг в неделю Ab3, демонстрировали снижение экспрессии обоих коллагеновых генов по сравнению с UUO + IgG ($P<0,05$). Получение 10 мг/кг в неделю Ab2 также подавляло индукцию фиброзных генов, вызванную UUO ($P<0,005$, по сравнению с UUO + IgG). Образцы из группы, получавшей 3 мг/кг в неделю Ab2, также демонстрировали тенденцию к снижению экспрессии *Col3a1*, хотя этот эффект не достигает статистической значимости. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что ингибирование TGFβ1 с помощью или Ab2, или Ab3 значительно улучшает индукцию коллагена, связанную с UUO.

[674] Воздействие получения Ab2 или Ab3 на экспрессию генов фибронектина и лизилоксидазоподобного белка 2

[675] *Fn1* и *Loxl2* кодируют белки, которые играют роль в депонировании и жесткости внеклеточного матрикса при фиброзе. Как показано на **фиг. 5B**, оба гена повышающе регулируются в образцах из группы UUO + IgG (P<0,005, по сравнению с мнимой операцией + IgG), хотя кратное увеличение экспрессии генов для обоих генов, но особенно для *Lox12* , меньше, чем для коллагеновых генов. В образцах, получавших Ab3 3, 10 или 30 мг/кг в неделю, отмечали тенденцию к снижению *Fn1* и *Loxl2* (по сравнению с UUO + IgG), но этот эффект лечения статистически значим только для экспрессии *Loxl2* и только при дозе 3 мг/кг в неделю (*Fn1* при дозе 10 мг/кг в неделю приближается к статистической значимости с P=0,07). Введение 10 мг/кг в неделю Ab2, однако, приводит к очень значимому (P<0,005, по сравнению с UUO + IgG) ингибированию как *Fn1*, так и *Loxl2*. Более низкая доза Ab2 3 мг/кг в неделю приводит к снижению как *Fn1*, так и, в частности, *Loxl2* (P=0,06), хотя подавление ни одного из генов не является статистически значимым.

[676] **Фиг. 6** обобщает статистическую значимость изменений экспрессии генов (по сравнению с UUO + IgG) после лечения в модели UUO. Ab3 показал снижение *Col1a1* и *Col3a1* при всех протестированных дозах. Статистически значимые изменения также наблюдали для *Itga11* и *Loxl2* (оба уровня снижались относительно UUO + IgG), но только при дозе 3 мг/кг в неделю. Напротив, все исследованные гены, за исключением *Mmp2*, показали статистически значимое изменение экспрессии (все уровни снижены по сравнению с UUO + IgG) после получения 10 мг/кг в неделю Ab2. Экспрессия *Col1a1* и *Lox* также снижалась при дозе 3 мг/кг в неделю.

Пример 5: Ингибирование TGFβ-сигнализации антителами против proTGFβ1 в генетической модели синдрома Альпорта

[677] Модель на мышах Col4a3-/- представляет собой принятую генетическую модель аутосомно-рецессивного синдрома Альпорта. У мышей Альпорта отсутствует функциональный ген коллагена 4A3 (Col4A3-/-), и поэтому они не могут образовывать нормальные тримеры коллагена IV типа, для которых требуются цепи α3, α4 и α5. У мышей Col4a3-/- развивается фиброз в почках, соответствующий фиброзу почек у пациентов-людей, включая интерстициальный фиброз и канальцевую атрофию, и у мышей Col4a3-/- развивается терминальная стадия почечной недостаточности (ESRD) в возрасте от 10 до 30 недель в зависимости от генетического фона мыши. Структурное и функциональное проявление почечной патологии у мышей Col4a3-/- в сочетании с прогрессированием до ESRD делает мышей Col4a3-/- идеальной моделью для понимания фиброза почек. Предыдущие сообщения указывают на важность сигнального пути TGFβ в этом процессе,

и сообщалось, что лечение или интегрином αvβ6, известным активатором TGFβ, или ловушкой лигандов TGFβ предотвращает почечный фиброз и воспаление у мышей Альпорта (Hahm *et al.*, (2007) *The American Journal of Pathology*, 170(1): 110-125).

[678] Ab3 и Ab2, которые представляют собой изоформно-специфичные ингибиторы активации TGFβ1, тестировали на их способность ингибировать или смягчать почечный фиброз у мышей Альпорта следующим образом.

[679] Для исследования использовали потомство F1 от самцов Col4a3+/- на генетическом фоне 129/Sv, скрещенных с самками Col4a3+/- на генетическом фоне C57/Bl6. Эти мыши обычно проявляют протеинурию к 4-5-недельному возрасту и обычно прогрессируют до ESRD к 14-15-недельному возрасту, что обеспечивает хорошее терапевтическое окно для проверки эффективности лечения.

[680] Хорошо задокументировано, что активация рецептора TGFβ приводит к нисходящему сигнальному каскаду внутриклеточных событий, включая фосфорилирование SMAD2/3. Поэтому способность антитела Ab2 ингибировать TGFβ-сигнализацию можно оценивать в образцах лизата почек путем измерения относительных уровней фосфорилирования SMAD2/3 по данным анализа ELISA (Cell Signaling Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Соответственно, 9-недельным мышам Col4a3-/- вводили 10 мг/кг Ab2 интраперитонеально (и/п) за 48 часов до умерщвления животных и сбора тканей. На **фиг. 7A** представлен график, показывающий относительные соотношения фосфорилированных и общих (фосфорилированных и нефосфорилированных) SMAD2/3. Однократной дозы Ab2 было достаточно для значительного ингибирования pSMAD2/3-сигнализации в лизате целых почек 9-недельных мышей Col4a3-/-, что демонстрирует эффективное взаимодействие Ab2 с мишенью в этой модели.

[681] В отдельном исследовании мышам Col4a3-/- вводили Ab2 или Ab3, начиная с шести недель после рождения. Мышам два раза в неделю вводили и/п или 5 мг/кг, или 1,5 мг/кг Ab3 или 1,5 мг/кг Ab2 в течение теста продолжительностью шесть недель. IgG использовали в качестве отрицательного контроля как у гетерозиготных (Col4a3+/-; Het), так и у нокаутных (Col4a3-/-; KO) мышей. После шести недель введения антител (12 недель после рождения) животных умерщвляли и брали почки для анализа.

[682] На **фиг. 7B** показаны относительные соотношения фосфорилированных и общих SMAD2/3 в лизатах целых почек, полученных из образцов животных, получавших Ab3 или Ab2. Введение любого антитела приводит к значительному снижению относительного фосфорилирования SMAD2/3 по сравнению с получавшими IgG мышами

Col4a3-/-. Средние отношения SMAD у получавших антитела KO мышей были такими же, как у гетерозиготного контроля.

[683] Для оценки функционального эффекта ингибирования TGFβ было проведено третье исследование на модели Col4a3-/- фиброза почек. В этом случае мыши получали два раза в неделю и/п дозу 5 мг/кг Ab3 или Ab2, начиная с шести недель после рождения и продолжая до умерщвления мышей в возрасте 14 недель. Эффект введения оценивали по экспрессии генов, которую определяли с помощью количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР), используя кДНК, полученную из почек мышей в этом исследовании. На **фиг. 7C** показана экспрессия генов, кодирующих три белка, обычно связанных с фиброзом, коллаген 1 (Col1a1), коллаген 3 (Col3a1) и фибронектин 1 (Fn1). В почках Col4a3-/- от животных, получавших контрольное антитело IgG, экспрессия всех трех генов была значительно повышающе отрегулирована относительно гетерозиготных мышей Col4a3+/-. Введение Ab2 значительно снижало экспрессию Col1a1 и Col3a1 у мышей Col4a3-/-. Экспрессия Fn1 продемонстрировала аналогичную тенденцию у получавших Ab2 мышей Col4a3-/-, хотя этот эффект не был статистически значимым ($P<0,09$).

Пример 6: Ингибирование TGFβ-сигнализации антителами против proTGFβ1 в модели NASH у мышей с диетой с дефицитом холина и высоким содержанием жиров (CDHFD).

[684] Диета с дефицитом холина и высоким содержанием жиров (CDHFD) является принятой диетической моделью неалкогольного стеатогепатита (NASH). В этой модели самцов мышей C57BL/6J кормят диетой с дефицитом холина, 0,1% метионина и высоким содержанием жиров в течение 12 недель. Через три-шесть недель после начала CDHFD увеличивается экспрессия белка α-sma (маркер активации звездчатых клеток печени), и развитие фиброза печени сопровождается повышением содержания гидроксипролина, что сопровождается увеличением синтеза и депонирования внутрипеченочного коллагена (Matsumoto *et al.*, *Int J Exp Pathol*. 2013 Apr;94(2):93-103).

[685] Ab3 и Ab2 тестировали на их способность ингибировать и/или снижать степень фиброза печени у мышей на CDHFD следующим образом.

[686] Животные в тестовых когортах были на CDHFD на протяжении всего исследования. Отдельная группа мышей получала обычную диету как контрольная группа исследования. Антитела Ab3 и Ab2 вводили мышам посредством интраперитонеальной (и/п) инъекции, начиная с 4 недель после начала CDHFD. Тестовые концентрации антител были следующими: 15 мг/кг, 5 мг/кг или 1,5 мг/кг два раза в неделю (то есть 30, 10 или 3 мг/кг в неделю) в течение теста продолжительностью 8 недель (то есть недель с 4 по 12). Антитело изотипа IgG использовали в качестве отрицательного контроля в дозе 15 мг/кг

два раза в неделю (30 мг/кг в неделю). После 8 недель дозирования животных умерщвляли и брали печень для анализа.

[687] Также проводили измерения в сыворотке для определения экспозиции циркулирующих антител во время исследования. Образцы сыворотки собирали через 72 часа после введения дозы Ab2 на 6, 8 и 10 неделе. На 12 неделе животным вводили последнюю инъекцию Ab2, и брали сыворотку через 6 часов после инъекции и во время умерщвления. На **фиг. 8A** показаны уровни Ab2 в сыворотке в течение всего периода исследования, что указывает на количественные уровни экспозиции Ab2 в сыворотке на протяжении всего исследования. Две самые высокие тестовые дозы Ab2 в 15 и 5 мг/кг (2 раза в неделю) обеспечивают наилучший охват на протяжении всего исследования, несмотря на предполагаемый эффект от повышения уровня антител к лекарственному средству на протяжении 8 недель дозирования (van Brummelen *et al.*, *The Oncologist*. 2016 Jul;21:1-9)

[688] Взаимодействие с рецептором TGFβ1 приводит к внутриклеточным сигнальным событиям, включая фосфорилирование SMAD2 и SMAD3. Соответственно, Ab3 и Ab2 тестировали на их способность ингибировать SMAD2/3 в лизатах печени мышей, получавших CDHFD, с помощью ELISA (Cell Signaling Technologies) в соответствии с протоколом производителя. Как показано на **фиг. 8B**, Ab2 значительно снижает относительное соотношение фосфорилированных SMAD2/3 по сравнению с контрольным IgG. На **фиг. 8C** показана обратная корреляция между уровнями Ab2 в сыворотке и фосфорилированными SMAD2/3. На **фиг. 8D** показано, что Ab2 значительно снижает фосфорилирование SMAD2/3 по сравнению с мышами, которые получали Ab3 и IgG на CDHFD (смотри, например, при дозе 1,5 мг/кг).

[689] Гидроксипролин является характерной аминокислотой для фибриллярных коллагенов и составляет примерно 13,5% белка. Фиброз, который происходит в печени, может перерастать в хронический гепатит, склероз печени, рак печени, легочный фиброз и гломерулонефрит (Qui *et al.*, 2014 *Mol.Med. Rep exposure orts* 2014 10;1157-1163). Гидроксипролин играет роль важного диагностического индикатора тяжести фиброза. Как показано на **фиг. 8E**, животные, подвергавшиеся введению Ab3 и Ab2, демонстрировали заметное снижение депонирования коллагена по сравнению с контрольными животными на CDHFD, которым вводили контрольное Ab IgG, что указывает на положительный эффект введения.

[690] Для оценки уровней депонирования коллагена 1 типа в печени мышей, получавших CDHFD, были разработаны протоколы иммуногистохимии (IHC) для антитела к мышиному коллагену I типа (кроличье поликлональное; Abcam; ab21286) с

использованием системы окрашивания Leica Bond RX. Печень мышей собирали и фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (NBF) в течение 24 часов при комнатной температуре. Затем фиксированные печени нарезали на поперечные срезы по 3-5 мм и хранили в 70% этаноле до процесса пропитывания и заливки парафином. Залитые парафином печени нарезали по 4 мкм и помещали на предметные стекла для IHC-окрашивания. Первичное антитело к коллагену 1 типа использовали в конечной концентрации 5 мкг/мл вместе с первичным контролем соответствующего изотипа (кроличий моноклональный IgG; Cell Signaling Technologies; 3900S). Поиск эпитопов проводили с использованием цитратного буфера с pH 6, инкубированного при 100°C в течение 20 минут. Предметные стекла промывали буфером на основе трис, инкубировали с блокирующим пероксид реагентом, затем промывали 3 раза в буфере и инкубировали с блокирующим белок реагентом в течение 20 минут перед 30-минутной инкубацией с первичным антителом. Предметные стекла снова промывали буфером перед инкубацией с конъюгатом HRP-полимер от Leica в течение 8 минут. Затем предметные стекла промывали 2 раза в буфере и 1 раз в деионизированной (DI) воде перед инкубацией с хромогеном диаминобензидином (DAB) от Leica в течение 10 минут. Затем предметные стекла промывали 3 раза DI водой перед контрастным окрашиванием гематоксилином в течение 5 минут. После заключительных стадий промывания окрашенные предметные стекла для IHC обезвоживали и заключали под покровное стекло с использованием заливочной среды на основе ксилола.

[691] Окрашенные предметные стекла посылали в HistoTox Labs для визуализации с помощью сканера цельных препаратов Aperio AT2, и окрашивание коллагена анализировали с использованием программного обеспечения для анализа изображений Visiopharm. Области интереса (ROI) выбирали путем цифрового отслеживания периметра ткани, помечая каждый участок для анализа. Участки ткани со складками или разрывами исключали из анализа. Общую положительную по коллагену площадь измеряли с использованием алгоритма сравнения с порогом на основе интенсивности, который классифицировал каждый пиксель изображения как область высокоположительного, среднеположительного, низкоположительного или отрицательного окрашивания. Области с высокими, средними и низкими пикселями суммировали вместе как единое положительное значение и делили на общую проанализированную площадь ткани, что давало процент положительной по коллагену области в ткани. Как показано на **фиг. 8F**, животные, подвергшиеся введению 15 мг/кг Ab2, характеризовались меньшей общей положительной по коллагену I площадью, чем контрольные животные на CDHFD. На **фиг. 8G** показано, что животные, получавшие Ab2, демонстрировали обратную корреляцию

между уровнями его экспозиции в конце исследования и IHC-положительной по коллагену площадью; животные с высокой экспозицией демонстрировали гораздо меньшее содержание коллагена по IHC, что указывает на более низкие уровни фиброза в печени.

Пример 7: Ингибирование TGFβ-сигнализации антитела против proTGFβ1 в модели фиброза печени, вызванного CCL_4

[692] Обработка мышей тетрахлоридом углерода (CCl_4) является хорошо известной моделью фиброза печени. В этой модели мышам Balb/C вводили интраперитонеально (и/п) два раза в неделю по 2,5 мкл 20% раствора CCl_4 в кукурузном масле на грамм массы тела. Эту дозу CCl_4 поддерживали на протяжении всего исследования (6 недель). После двух недель введения CCl_4 начинали введение тестируемых образцов. Мышам вводили и/п или дозы Ab2 или Ab3 по 15 мг/кг, 5 мг/кг или 1,5 мг/кг два раза в неделю (то есть по 30, 10 или 3 мг/кг в неделю) с дозами антитела 1D11 к пан-TGFβ по 5 мг/кг два раза в неделю (10 мг/кг в неделю), или дозы контрольного антитела IgG по 15 мг/кг два раза в неделю (30 мг/кг в неделю). После 6 недель введения CCl_4 (4 недель введения антитела) мышей умерщвляли и собирали ткань печени.

[693] Для измерения фиброза в лизатах печени из этого исследования использовали анализ гидроксипролина (смотри описание выше). На **фиг. 9** показаны результаты этого анализа, в котором введение всех доз Ab3 или высокой (15 мг/кг) дозы Ab2 показало статистически значимое снижение уровня гидроксипролина в печени. У мышей, получавших более низкие дозы Ab2 (5 или 1,5 мг/кг), наблюдали тенденцию к снижению уровня гидроксипролина в печени, но эти различия не являются статистически значимыми из-за экспериментальных отклонений в этой модели. Эффект от введения обоих TGFβ1-специфичных антител был аналогичен эффекту ингибитора пан-TGFβ 1D11.

Пример 8. Определение связывающих участков для Ab3 и Ab2 с помощью HDX-MS.

[694] Масс-спектрометрия с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS) является широко используемым методом для изучения конформации белка в растворе. Методология HDX-MS описана, например, в документе Wei *et al.*, *Drug Discov Today.* 2014 January; 19(1): 95–102; Engen JR. Anal Chem. 2009 Oct 1;81(19):7870-5, включенном в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте. HDX-MS основана на обмене амидных атомов водорода основной цепи белка с дейтерием в растворе. Амидные атомы водорода основной цепи, участвующие в слабых водородных связях или расположенные на поверхности белка, могут быстро обмениваться, в то время как те, что спрятаны внутри или участвуют в стабилизации водородных связей, обмениваются медленнее. На основании разности масс водорода (1 Да) и дейтерия (2 Да), которую можно детектировать, например, с помощью

масс-спектрометрии, можно отслеживать обмен H-D с течением времени. Таким образом, измеряя скорость HDX амидных атомов водорода основной цепи, можно получать информацию о динамике белка, конформации и белок-белковом взаимодействии, таком как связывание антитело-антиген.

[695] Чтобы получить информацию для целей картирования эпитопов, проводили HDX-MS для определения связывающих участков proTGFβ1, участвующих в связывании Ab3-антиген (например, где в комплексе proTGFβ происходит связывание Ab3). При HDX-MS участки антигена, которые прочно связаны антителом, защищены от протонного обмена благодаря межбелковому взаимодействию, тогда как участки, которые подвергаются воздействию растворителя, могут легко подвергаться протонному обмену. На основании этого были идентифицированы связывающие участки внутри антигена, которые защищены специфическим связыванием антитела.

[696] Модифицированный комплекс proTGFβ1 (proTGFβ1 C4S), в котором остаток цистеина в положении 4 продомена заменен остатком серина (описан в WO 2014/182676), использовали для оценки связывания Ab3 с помощью HDX-MS. Известно, что цистеины гомодимера proTGFβ1 участвуют в образовании ковалентных связей с презентирующей молекулой, такой как LTBP, GARP и LRRC33. В эксперименте использовали молярное соотношение proTGFβ1 к Fab Ab3 1:3. Результат обобщен на **фиг. 10A**. Как показано, существует по меньшей мере три участка (отмеченные участки 1, 2 и 3 на **фиг. 10A**) в proTGFβ1, где обмен H/D значительно защищен при связывании с Fab Ab3, что позволяет предположить, что эти участки или их части могут представлять собой участок (участки) связывания Ab3 с proTGFβ1. Участок 1 (SQGEVPPGPLPEAVLALYNST; SEQ ID NO: 258) приводил к самому высокому обмену H/D среди всех пептических пептидов, определенных в proTGFβ1, и его картировали в лассо латентности внутри продомена proTGFβ1. Двумя другими участками, которые демонстрировали значительную защиту обмена H/D, оказались участок 2 (LREAVPE; SEQ ID NO: 259) и участок 3 (YHANFCLG; SEQ ID NO: 260), и их картировали на спирали α3 внутри продомена и части фактора роста proTGFβ1, соответственно. Выравнивание аминокислотных последовательностей участков 1 и 2 при сравнении всех трех изоформ proTGFβ показало значительное разнообразие последовательностей в этих участках (смотри **фиг. 10B**), и, таким образом, дает структурный аргумент в пользу специфичности Ab3 в отношении proTGFβ1 по сравнению с другими изоформами.

[697] Чтобы получить дополнительную структурную информацию о механизме связывания Ab2 с proTGFβ1, авторы настоящего изобретения проводили HDX-MS на proTGFβ1 C4S с Fab Ab2 с использованием молярного соотношения proTGFβ1 к Fab Ab2

1:3 (смотри **фиг. 10C**). Как показано на **фиг. 10C**, существует по меньшей мере три участка в proTGFβ1, которые демонстрируют значительную защиту обмена H/D, что позволяет предположить, что эти участки или их части могут представлять собой участок (участки) связывания Ab2 в proTGFβ1. Участок 1 (SPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNST; SEQ ID NO: 261) показал самый высокий обмен H/D среди всех пептических пептидов, определенных в proTGFβ1, и его картировали в лассо латентности внутри продомена proTGFβ1. Участки 2 (LREAVPE; SEQ ID NO: 259) и 3 (WKWIHEPKGYHANFCLG; SEQ ID NO: 262) картировали на спирали α3 внутри продомена и части фактора роста proTGFβ1, соответственно. Выравнивание аминокислотных последовательностей участков 1 и 2 при сравнении всех изоформ proTGFβ -1, -2 и -3 показало разнообразие последовательностей в этих участках (смотри **фиг. 10D**) и может давать структурный аргумент в пользу специфичности Ab2 в отношении proTGFβ1 по сравнению с другими изоформами.

Пример 9: Определение связывающих участков proTGFβ1 для Ab2 с помощью рентгеновской кристаллографии

[698] Эпитоп Ab2 в proTGFβ1 дополнительно изучали путем определения кристаллической структуры тройного комплекса человеческий proTGFβ1:Ab2-Fab:AbX-Fab. В этой работе использовали нерасщепляемый вариант C4S/R249A человеческого proTGFβ1, который охватывает остатки 30–390 полноразмерной последовательности человеческого proTGFβ1 (Uniprot ID P01137). В системе нумерации, которая будет использоваться в остальной части этого документа, положение 1 будет обозначать первый аминокислотный остаток после удаления сигнальной последовательности для изоформ proTGFβ. Мутация C4S делает proTGFβ1 неспособным к ковалентному сшиванию с любыми известными презентирующими молекулами, например LTBP и GARP, тогда как R249A делает proTGFβ1 устойчивым к расщеплению пропротеинконвертазой/фуриновой протеазой, тем самым сохраняя proTGFβ1 в его нерасщепленной пробелковой форме. ProTGFβ1 C4S/R249A коэкспрессировали с меченым 6x-His на C-конце (SEQ ID NO: 302) Ab2-Fab в системе expi293 для экспрессии млекопитающих, обработанной кифунензином для уменьшения случаев N-связанного гликозилирования. ProTGFβ1 C4S/R249A:Ab2-Fab подвергали аффинной очистке, обрабатывали эндогликозидазой H и очищали с помощью гель-фильтрации. Затем комплекс proTGFβ1 C4S/R249A:Ab2-Fab инкубировали с AbX-Fab для получения тройного комплекса. AbX-Fab в этом контексте использовали в качестве вспомогательного белка, который действует как шаперон кристаллизации для увеличения вероятности получения кристаллов белка.

[699] Эксперименты по кристаллизации проводили при комнатной температуре в формате сидячей капли. Кристаллы, пригодные для рентгеноструктурного анализа,

получали с использованием 18% полиэтиленгликоля 6000, 0,2 М $MgCl_2$, 0,1 М натрий-ацетатного буфера, pH 5,0. Кристаллы подвергали криозащите замачиванием в маточном растворе с добавлением 25% глицерина и быстрой заморозкой в жидком азоте. Данные рентгеновской дифракции собирали на усовершенствованном фотонном источнике (APS) SER-CAT beamline 22-ID Аргоннской национальной лаборатории (ANL) с использованием детектора Dectris Eiger 16M. Дифракционные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения детектора рентгеновского излучения (XDS) в пространственной группе C2221 с асимметричной единицей, содержащей одну половину комплекса 2:2:2. Структуру тройного комплекса определяли с помощью молекулярного замещения с использованием Phaser. Ab2-Fab моделировали с использованием структуры Fab тех же зародышевых линий человека IGKV1-39/IGHV3-23 (PDB ID 5I19). AbX-Fab моделировали с использованием структуры Fab человеческих зародышевых линий IGHV1/IGKV3-11 (PDB ID 5I16). Ядро мономера proTGFβ1 моделировали с использованием ранее опубликованной кристаллической структуры proTGFβ1 (PDB ID 5VQP). Структуру вручную перестраивали с помощью Coot и уточняли с помощью Refmac5 до конечного разрешения 3,4 Å со значениями R_{work} и R_{free} 21% и 29%, соответственно.

[700] В рассматриваемой кристаллической форме proTGFβ1 существует в виде гомодимера, расположенного на кристаллографической оси второго порядка, так что асимметричная единица содержит один мономер proTGFβ1 и два Fab, в то время как весь комплекс имеет стехиометрию 2:2:2 (**фиг. 11**). Ab2-Fab и AbX-Fab не конкурируют за связывание с proTGFβ1. Исходя из этого факта, их связывающие эпитопы на proTGFβ1 пространственно удалены. Ab2-Fab связывает линейный эпитоп, образуемый остатками 35-43 в богатой пролином петле proTGFβ1 в пределах лассо латентности. Pro40 и Pro41 в proTGFβ1 особенно важны для связывания, поскольку они участвуют в пи-стэкинг-взаимодействиях с Trp104 и Tyr59 в H-CDR3 и H-CDR1, соответственно, в Ab2-Fab. Также имеют место соответствующие взаимодействия остатков фактора роста (R274, K280, H283) с остатками тяжелой (S101, G102, H103) и легкой (Y49) цепи Fab Ab2. Наконец, выравнивание последовательностей участка эпитопа в лассо латентности по семейству TGFβ показало значительное разнообразие, которое обеспечивает исключительную специфичность Ab2 относительно других соответствующих членов семейства TGFβ, например TGFβ2, TGFβ3. Эпитоп и паратоп для взаимодействия между proTGFβ1 и Ab2-Fab приведены в **таблице 24**.

Таблица 24. Эпитоп и паратоп для взаимодействия между proTGFβ1 и Ab2-Fab. Буквы h и l обозначают тяжелую и легкую цепи, соответственно

ProTGFβ1	**Ab2**

(эпитоп)	(паратоп)
S35	D31*h*
G37	D31*h*, A33*h*
E38	S54*h*
V39	G102*h*
P40	W104*h*, Y59*h*
P41	W104*h*, Y59*h*
G42	T91*l*, Y92*l*, Y32*l*
P43	Y92*l*, Y32*l*
R274	Y49*l*
K280	S101*h*, H103*h*
H283	G102*h*

Пример 10. Ab3 и Ab2 проявляют пониженную токсичность по сравнению с ингибитором киназы ALK5 LY2109761 и антителом к пан-TGFβ

[701] Для оценки потенциальной токсичности Ab3 и Ab2 *in vivo* по сравнению с низкомолекулярным ингибитором киназы-рецептора TGF-β типа I (ALK5) LY2109761 (CAS № 700874-71-1) и с антителом к пан-TGFβ (hIgG4; нейтрализует все три фактора роста TGFβ) провели исследования токсичности на крысах. Выбор крыс в качестве вида для этого токсикологического исследования основан на предыдущих сообщениях о том, что крысы более чувствительны к ингибированию TGFβ по сравнению с мышами. Токсичность, аналогичную наблюдаемой у крыс, также наблюдали у других видов млекопитающих, таких как собаки, отличные от человека приматы, а также у людей.

[702] Самкам крыс Fischer344 (**фиг. 12A и 12B**) или крысам Спрег-Доули (SD) вводили Ab3 в дозе 3 мг/кг (1 группа, n=5), в дозе 10 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); Ab2 в дозе 10 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); антитело к пан-TGFβ в дозе 3 мг/кг (1 группа, n=5), в дозе 10 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 контрольный носитель ФСБ (pH 7,4) (1 группа, n=5).

[703] Животным, получавшим антитело к пан-TGFβ, вводили дозу однократно внутривенно (в день 1) в объеме 10 мл/кг, умерщвляли их в день 8 и проводили вскрытие. Животным, получавшим или Ab3, или Ab2, вводили дозу один раз в неделю в течение 4 недель в объеме 10 мл/кг. Животным, получавшим LY2109761, вводили дозу через

желудочный зонд один раз в день в течение пяти или семи дней. Животных умерщвляли и проводили вскрытие.

[704] Как показано на **фиг. 12A** и в **таблице 25**, животные, которым вводили антитело к пан-TGFβ, демонстрировали наличие токсичности, аналогичной описанной у животных, которым вводили LY2109761, как описано в международной патентной публикации № WO/2018/129329, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте. В частности, животные, которым вводили ≥3 мг/кг антитела к пан-TGFβ, демонстрировали нарушения в сердечном клапане (например, вальвулопатию), аналогичные описанным у животных, которым вводили LY2109761. Животные, которым вводили ≥30 мг/кг антитела к пан-TGFβ, демонстрировали нарушения в предсердии, аналогичные описанным у животных, которым вводили LY2109761. Животные, которым вводили 100 мг/кг антитела к пан-TGFβ, демонстрировали нарушения в миокарде, аналогичные описанным у животных, которым вводили LY2109761, а у животных, которым вводили 30 мг/кг антитела к пан-TGFβ, наблюдали кровоизлияние в миокард. У одного животного, которому вводили 100 мг/кг антитела к пан-TGFβ, наблюдали умеренный интрамуральный некроз с кровоизлиянием в коронарную артерию, который был связан с небольшими периваскулярными инфильтратами смешанных воспалительных клеток. Костные нарушения у животных, которым вводили антитело к пан-TGFβ и LY2109761, включали видимые изменения формы грудины и видимое повышение толщины гипертрофической зоны в замыкающей пластинке грудины и пластинке роста бедренной и большеберцовой костей. Последующие исследования на другой линии крыс (крысы SD) с LY2109761 и пан-TGFβ, как показано на **фиг. 12C,** также продемонстрировали наличие аналогичной токсичности.

Таблица 25. Результаты микроскопического исследования сердца у животных, получавших антитело к пан-TGFβ

	Антитело к пан-TGFβ			
Уровень дозы (мг/кг/день)	0	3	30	100
Сердце				
Сердечные клапаны				
Вальвулопатия				
Минимальная	0	2	0	0
Слабая	0	2	4	5
Умеренная	0	0	1	0
Предсердие				
Инфильтрат, смешанноклеточный				

	Минимальный	0	0	1	2
	Слабый	0	0	1	1
Гиперплазия, эндотелий					
	Минимальная	0	0	3	1
Кровоизлияние					
	Минимальное	0	0	1	0
Миокард					
Дегенерация/некроз					
	Слабый	0	0	0	2
Кровоизлияние					
	Минимальное	0	0	2	1
	Слабое	0	0	1	1
Инфильтрат, смешанноклеточный, основной					
	Слабый	0	0	0	1
Коронарная артерия					
Некроз с кровоизлиянием					
	Умеренный	0	0	0	1
Инфильтрат, смешанноклеточный, периваскулярный					
	Слабый	0	0	0	1

[705] Однако, в отличие от животных, получавших антитело к пан-TGFβ или LY2109761, животные, которым вводили Ab3 или Ab2 в течение 4 недель, не продемонстрировали наблюдаемой связанной с тестируемым веществом токсичности ни у одной из в линий крыс, а NOAEL как для Ab3, так и для Ab2 оказался равен дозе 100 мг/кг еженедельно, которая была наивысшей протестированной дозой (**фиг. 12B и 12D**).

[706] Таким образом, животные, получавшие Ab3 или Ab2 во всех протестированных дозах (10 мг/кг, 30 мг/кг или 100 мг/кг) в течение *4 недель*, не проявляли никаких токсических эффектов по сравнению с фоном по любому из следующих параметров: дегенерация или некроз миокарда, кровоизлияние в предсердие, кровоизлияние в миокард, кровоизлияние в клапан, гиперплазия эндотелия клапана, гиперплазия стромы клапана, инфильтраты смешанными воспалительными клетками в клапанах сердца, минерализация, некроз с кровоизлиянием в коронарную артерию, некроз с воспалением в корне аорты, некроз или воспалительный клеточный инфильтрат в кардиомиоците и вальвулопатия. NOAEL как для Ab3 (в крысах Fischer и в крысах SD), так

и для Ab2 (в крысах SD) оказался равен еженедельной дозе 100 мг/кг, наивысшей протестированной дозе . Таким образом, введение изоформно-специфичных ингибиторов активации TGFβ1 неожиданно приводило к значительному улучшению профилей безопасности, например снижению смертности, снижению кардиотоксичности и уменьшению костных нарушений по сравнению с пан-TGFβ-ингибированием.

Пример 11: Биоинформационный анализ относительной экспрессии TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3

[707] Для оценки экспрессии изоформ TGFβ в раковых опухолях изучали данные об экспрессии генов (RNAseq) из общедоступных наборов данных. Используя общедоступный инструмент с онлайн-интерфейсом (Firebrowse) для изучения экспрессии изоформ TGFβ в Атласе ракового генома (TCGA), впервые исследовали дифференциальную экспрессию РНК, кодирующей изоформы TGFβ, как в нормальной, так и в раковой ткани. Отбирали все наборы данных по RNAseq опухолей в базе данныхTCGA, для которых существуют данные сравнения нормальной ткани, и исследовали экспрессию генов TGFB1, TGFB2 и TGFB3 (**фиг. 13A**). Данные из интерфейса Firebrowse представлены в виде log2 от числа прочтений на тысячу нуклеотидов на миллион (RPKM).

[708] Эти данные свидетельствуют о том, что в большинстве типов опухолей (серый) TGFB1 является наиболее экспрессируемым транскриптом изоформ TGFβ со значениями log2(RPKM) обычно в диапазоне 4-6, по сравнению с 0-2 для TGFB2 и 2-4 для TGFB3. Авторы настоящего изобретения также отметили, 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 TGFβ может быть связана с раковыми клетками. Из-за потенциальной роли TGFβ-сигнализации в подавлении иммунной системы хозяина в микроокружении рака авторам настоящего изобретения было интересно отметить, что количество транскриптов TGFB1 повышалось при типах рака, для которых одобрены анти-PD-1 или анти-PD-L1-терапии – эти показания отмечены серым на **фиг. 13A**.

[709] Следует отметить, что хотя обычно минимальным значением, связанным с биологически значимой экспрессией генов, считается RPKM>1 (Hebenstreit *et al.*, *Molecular Systems Biology* (2011) 7:497; Wagner *et al.*, Theory Biosci. 2013 Sep;132(3):159-64), однако для последующего анализа использовали более строгие пороговые значения RPKM (или связанной меры FPKM (смотри Conesa *et al.*, *Genome Biology* vol. 17: 13 (2016))) >10 или >30 во избежание ложноположительных результатов. Для сравнения все три порога указаны на **фиг. 13A**.

[710] Большие межквартильные диапазоны на **фиг. 13A** указывают на значительную вариабельность экспрессии изоформы TGFβ среди отдельных пациентов. Для идентификации раков, при которых по меньшей мере у подмножества пациентов есть опухоли, которые дифференциально экспрессируют изоформу TGFβ1, данные RNAseq от отдельных опухолевых образцов в наборе данных TCGA анализировали, вычисляя число фрагментов на тысячу оснований на миллион (FPKM). RPKM и FPKM примерно эквивалентны, хотя FPKM исправляет двойной подсчет прочтений на противоположных концах одного и того же транскрипта (Conesa *et al.*, Genome Biology vol. 17: 13 (2016)). Опухолевые образцы оценивали как положительные в отношении экспрессии TGFβ1, TGFβ2 или TGFβ3, если значение FPKM транскрипта составляло >30, и вычисляли долю пациентов (выраженную в %) с каждым типом рака, которые экспрессировали каждую изоформу TGFβ (**фиг. 13B**).

[711] Как показано на **фиг. 13B**, большинство типов опухолей в наборе данных TGCA демонстрируют значительный процент отдельных образцов, которые TGFβ1-положительны, причем некоторые типы рака, включая острый миелоидный лейкоз, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому и плоскоклеточную карциному головы и шеи, экспрессируют TGFβ1 в более чем 80% от всех опухолевых образцов. В соответствии с данными на **фиг. 13A**, меньше типов рака являются положительными по TGFβ2 или TGFβ3, хотя некоторые раки демонстрируют равный или больший процент опухолевых образцов, которые TGFβ3-положительны, включая инвазивную карциному молочной железы, мезотелиому и саркому. Эти данные позволяют предположить, что типы рака можно стратифицировать по экспрессии изоформ TGFβ, и что такая стратификация может быть полезна для идентификации пациентов, которые являются кандидатами на лечение изоформно-специфичными ингибиторами TGFβ.

[712] Для дальнейшего исследования этой гипотезы данные RNAseq в виде log2(FPKM) из подмножества отдельных опухолевых образцов наносили на тепловую карту (**фиг. 13C**), установив цветовой порог, отражающий FPKM>30 в качестве минимального уровня транскрипта для его оценки как положительного по изоформе TGFβ.

[713] Каждый образец представлен в виде одной строки на тепловой карте, и образцы упорядочены по уровню экспрессии TGFβ1 (самые высокие уровни экспрессии вверху). В соответствии с анализом на **фиг. 13B** значительное количество образцов при каждом типе рака являются положительными в отношении экспрессии TGFβ1. Однако это представление также подчеркивает тот факт, что многие опухоли экспрессируют транскрипты *исключительно* TGFβ1, особенно при типах рака карциноме пищевода, уротелиальном мочевом пузыре, аденокарциноме легкого и меланоме кожи. Интересно, что

такой сдвиг в сторону TGFB1 не является признаком всех раков, поскольку образцы инвазивной карциномы молочной железы демонстрируют гораздо большее количество TGFβ3-положительных образцов, чем TGFβ1-положительных. Тем не менее, этот анализ указывает на то, что изоформа β1 является преобладающим, а в большинстве случаев единственным членом семейства TGFβ, присутствующим в опухолях у большого количества раковых пациентов. Вместе с данными, подтверждающими, что TGFβ-сигнализация играет значительную роль в иммуносупрессии в микроокружении рака, эти результаты также указывают на полезность специфического ингибирования TGFβ1 при лечении этих опухолей.

[714] Для идентификации моделей на мышах для тестирования эффективности TGFβ1-специфичного ингибирования в качестве терапевтического средства против рака анализировали экспрессию изоформы TGFβ по данным RNAseq из различных клеточных линий, используемых в сингенных моделях опухолей на мышах. Для этого анализа были созданы два представления данных. Во-первых, аналогично данным на фигуре 3, авторы настоящего изобретения создали тепловую карту значений log2(FPKM) для опухолей, происходящих из каждой клеточной линии (**фиг. 13D**, слева). Поскольку этот анализ использовали для идентификации сингенных моделей, экспрессирующих TGFB1 на высоком уровне, которые являются TGFB2- и TGFB3-отрицательными, авторы настоящего изобретения в первую очередь уделили внимание тому, чтобы избежать ложноотрицательных результатов, и авторы настоящего изобретения установили «положительный» порог на FPKM>1, гораздо ниже, чем в представлениях на **фиг. 13B и 13C**.

[715] Как ясно видно из представления данных на **фиг. 13D (слева)**, ряд сингенных опухолей, включая MC-38, 4T-1 и EMT6, обычно экспрессируют на значительном уровне как TGFβ1, так и TGFβ3. Напротив, модели A20 и EL4 экспрессируют почти исключительно TGFβ1, а опухоли S91 и P815 демонстрируют сильный сдвиг в сторону экспрессии TGFB1.

[716] Для дальнейшей оценки дифференциальной экспрессии TGFβ1 по сравнению с TGFβ2 и/или TGFβ3 рассчитывали minΔTGFβ1, определяемый как меньшее значение из $log2(FPKM_{TGFB1})–log2(FPKM_{TGFB2})$ или $log2(FPKM_{TGFB1})–log2(FPKM_{TGFB3})$. MinΔTGFB1 для каждой модели показан в виде тепловой карты на **фиг. 13D (справа)** и подчеркивает тот вывод из **фиг. 13D (слева)**, что сингенные опухоли из клеточных линий A20, EL4, S91 и/или P815 могут представлять собой превосходные модели для тестирования эффективности TGFβ1-специфичных ингибиторов.

Пример 12. Воздействие Ab3 и Ab2 в комбинации с антителом против PD-1 на прогрессирование опухоли в сингенной модели рака мочевого пузыря на мышах MBT2

[717] Для оценки воздействия Ab3 и Ab2 в комбинации с анти-PD-1 антителом на уменьшение прогрессирования опухоли карциномы мочевого пузыря использовали сингенную модель рака мочевого пузыря на мышах MBT2. Это очень агрессивная и быстрорастущая модель опухоли и очень сложная с точки зрения преодоления прогрессирования опухоли с помощью лечения лекарственными средствами.

[718] Культура опухолевых клеток

[719] MBT-2 представляет собой низкодифференцированную клеточную линию рака мочевого пузыря мышей, полученную из трансплантируемого рака мочевого пузыря, индуцированного N-[4-(5-нитро-2-фурил)-2-тиазолил]формамидом у самки мыши C3H/He. Клетки культивировали в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1600 с 10% фетальной бычьей сыворотки и 100 мкг/мл стрептомицина в атмосфере 5% CO2 при 37°C. Культуральную среду заменяли через день, а пересев проводили, когда слияние клеток достигало 90%. Клетки собирали из субконфлюэнтных культур путем трипсинизации и промывали бессывороточной средой. Суспензии отдельных клеток с жизнеспособностью клеток >90% определяли с помощью исключения трипанового синего. Клетки перед инъекцией ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ).

[720] Имплантация *in vivo* и рост опухоли

[721] Клетки MBT2, используемые для имплантации, собирали во время логарифмической фазы роста и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). В день имплантации опухоли каждой тестируемой мыши вводили подкожно в бок 5×10^5 клеток (0,1 мл клеточной суспензии) и наблюдали за ростом опухоли. Когда опухоли достигали в среднем 40-80 мм^3, мышей случайным образом распределяли в группы по 15. Опухоли измеряли в двух измерениях с помощью штангенциркуля, а объем рассчитывали по формуле:

[722] Объем опухоли (мм^3) = $w^2\times l / 2$

[723] где w = ширина, а l = длина опухоли в мм. Массу опухоли можно оценить, исходя из предположения, что 1 мг эквивалентен 1 мм^3 объема опухоли.

[724] Лечение

[725] Мышам (n=15) с подкожными опухолями MBT2 (от 40 до 80 мм^3) в день 1 вводили интраперитонеально (и/п) один раз в неделю в течение 29 дней Ab3 в дозе 10 мг/кг в объеме дозирования 10 мл/кг, Ab3 в дозе 30 мг/кг в объеме дозирования 10 мл/кг, Ab2 в дозе 3 мг/кг в объеме дозирования 10 мл/кг или Ab2 в дозе 10 мг/кг в объеме дозирования 10 мл/кг. Крысиное антитело против мышиного PD-1 (RMP1-14-rIgG2a, BioXCell®) вводили и/п два раза в неделю в дозе 10 мг/кг в объеме дозирования 10 мл/кг в течение 29 дней.

[726] Группа 1 получала только анти-PD-1 антитело. Группа 2 получала Ab3 (10 мг/кг) в комбинации с анти-PD-1 антителом. Группа 3 получала Ab3 (30 мг/кг) в комбинации с анти-PD-1 антителом. Группа 4 получала Ab2 (3 мг/кг) в комбинации с анти-PD-1 антителом. Группа 5 получала Ab2 (10 мг/кг) в комбинации с анти-PD-1 антителом. Введение изотипического контроля использовали для контрольной группы (данные не показаны).

[727] Анализ конечной точки и задержки роста опухоли (TGD)

[728] Опухоли измеряли штангенциркулем два раза в неделю, и каждое животное безболезненно умерщвляли, когда его опухоль достигала конечного объема 1200 мм^3. Мыши, вышедшие из исследования по конечной точке объема опухоли, были задокументированы как безболезненно умерщвленные из-за прогрессирования опухоли (TP) с указанием даты безболезненного умерщвления.

[729] Частичный ответ (PR) вследствие лечения определяли как объем опухоли, составляющий 50% или менее от ее объема в день 1 при трех последовательных измерениях в ходе исследования и равный или превышающий 13,5 мм^3 в одном или более из этих трех измерений. При полном ответе (CR) объем опухоли составлял менее чем 13,5 мм^3 при трех последовательных измерениях в ходе исследования. Анти-PD-1/Ab3 в дозе 10 мг/кг приводили к 0 PR и 4 CR в конце исследования. Анти-PD-1/Ab3 в дозе 30 мг/кг приводили к 1 PR и 1 CR в конце исследования. Анти-PD-1/Ab2 в дозе 3 мг/кг приводили к 1 CR и к отсутствию других ответов при дозе 10 мг/кг. Задержку роста опухоли в процентах (%TGD) определяют как увеличение медианного времени до конечной точки в группе лечения по сравнению с не получавшим лечение контролем, выраженное в процентах от медианного времени до конечной точки (TTE) в контроле:

T= медианное TTE для лечения

C=медианное TTE для контроля

%TGD = ((T-C)/C)*100

[730] Анти-PD-1/Ab2%TGD при дозе 3 мг/кг составляла 11,4 и при дозе 10 мг/кг составляла 13,6. Анти-PD-1/Ab3 в дозе 10 мг/кг характеризовались 191%TGD, а в дозе 30 мг/кг 196.

[731] Как показано на **фиг. 14**, введение Ab3 как в дозе 10 мг/кг, так и в дозе 30 мг/кг в комбинации с анти-PD-1 и Ab2 как в дозе 3 мг/кг, так в дозе и 10 мг/кг в комбинации с анти-PD-1 задерживало рост опухоли по сравнению с введением только анти-PD-1. Как показано на **фиг. 14**, у большинства мышей, получавших только анти-PD-1, объем опухоли достигал 1024 мм^3 (как показано пунктирной линией) между приблизительно днем 8 и днем 20, тогда как мышам, получавшим Ab3 в дозе 10 мг/кг, Ab3 в дозе 30 мг/кг, Ab2 в дозе 3

мг/кг или Ab2 в дозе 10 мг/кг потребовалось вплоть до приблизительно 28 дней для достижения объема опухоли 1024 мм^3.

[732] На **фиг. 15** изображен график, показывающий медианный объем опухоли (мм^3) в день 15 у мышей, которым вводили Ab3 в дозе 30 мг/кг или 10 мг/кг или Ab2 в дозе 3 мг/кг или 10 мг/кг в комбинации с анти-PD-1. Как показано на **фиг. 15**, медианный объем опухоли в день 15 у мышей, получавших Ab3 в дозе 10 мг/кг, Ab3 в дозе 30 мг/кг или Ab2 в дозе 10 мг/кг, составлял приблизительно 700 мм^3 или менее, тогда как медианный объем опухоли в день 15 у мышей, получавших Ab2 в дозе 3 мг/кг или только анти-PD-1 составлял 1000 мм^3 или более.

Пример 13. Воздействие Ab3 и Ab2 в комбинации с антителом против PD-1 на прогрессирование опухоли в модели меланомного рака CloudmanS91 на мышах

[733] Для оценки воздействия Ab3 и Ab2 в комбинации с анти-PD-1 антителом на снижение прогрессирования меланомной опухоли использовали модель меланомы CloudmanS91 на мышах.

[734] Культура опухолевых клеток

[735] Клетки клона M3 [меланома Cloudman S91] (ATCC® CCL-53,1™) получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC) и поддерживали в CR Discovery Services в виде экспоненциально растущих суспензионных культур в модифицированной Кейном среде Хэма F12, дополненной 2,5% фетальной бычьей сыворотки, 15% лошадиной сыворотки, 2 мМ глутамина, 100 ед./мл натриевой соли пенициллина G, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина и 25 мкг/мл гентамицина. Опухолевые клетки выращивали в колбах для тканевых культур во влажном инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO_2 и 95% воздуха.

[736] Имплантация *in vivo* и рост опухоли

[737] В день имплантации опухоли каждой самке подопытной мыши DBA/2 вводили подкожно в бок 5×10^6 клеток CloudmanS91 в 50% Matrigel® и наблюдали за ростом опухоли. Когда опухоли достигали объема 125-175 мм^3, мышей случайным образом распределяли в группы по 12 с идентичными средними объемами опухоли и начинали дозирование. Опухоли измеряли в двух измерениях с помощью штангенциркуля, а объем рассчитывали по формуле:

Объем опухоли (мм^3) = $w^2\times l / 2$

где w = ширина, а l = длина опухоли в мм. Массу опухоли можно оценить, исходя из предположения, что 1 мг эквивалентен 1 мм^3 объема опухоли.

[738] Лечение

[739] Мышам (n=12) с подкожными опухолями CloudmanS91 (125-175 мм^3) в день 1 вводили интраперитонеально (и/п) дин раз в неделю в течение 60 дней Ab3 в дозе 10 мг/кг в объеме дозирования 10 мл/кг; Ab3 в дозе 30 мг/кг в объеме дозирования 10 мл/кг; Ab2 в дозе 10 мг/кг в объеме дозирования 10 мл/кг; или Ab2 в дозе 30 мг/кг в объеме дозирования 10 мл/кг. Крысиное антитело против мышиного PD-1 (RMP1-14-rIgG2a, BioXCell®) вводили и/п два раза в неделю в дозе 10 мг/кг в объеме дозирования 10 мл/кг в течение 60 дней.

[740] Группа 1 получала анти-PD-1 только антитело. Группа 2 получала Ab3 (10 мг/кг) в комбинации с анти-PD-1 антителом. Группа 3 получала Ab3 (30 мг/кг) в комбинации с анти-PD-1 антителом. Группа 4 получала Ab2 (10 мг/кг) в комбинации с анти-PD-1 антителом. Группа 5 получала Ab2 (30 мг/кг) в комбинации с анти-PD-1 антителом. Использовали не получавший лечение контроль, данные не показаны.

[741] Анализ конечной точки и задержки роста опухоли (TGD)

[742] Опухоли измеряли штангенциркулем два раза в неделю, и каждое животное безболезненно умерщвляли, когда его опухоль достигала конечного объема 2000 мм^3, или в конце исследования (день 60), в зависимости от того, что произошло раньше. Мыши, вышедшие из исследования по конечной точке объема опухоли, были задокументированы как безболезненно умерщвленные из-за прогрессирования опухоли (TP) с указанием даты безболезненного умерщвления. Время до конечной точки (TTE) для анализа вычисляли для каждой мыши в соответствии со способами, описанными в международной публикации патента № WO 2018/129329, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

[743] На **фиг. 16** показано медианное прогрессирование опухоли после лечения Ab3 или Ab2 в комбинации с анти-PD-1 антителом. Как показано на **фиг. 16,** введение Ab3 или Ab2 в дозе 10 мг/кг и 30 мг/кг в комбинации с анти-PD-1 задерживало рост опухоли. На **фиг. 17A** и **17B** представлены репрезентативные иммуногистохимические срезы модели опухоли CloudmanS91, окрашенной с помощью клеточного маркера CD8+. На **фиг. 18A** и **18B** представлены репрезентативные иммуногистохимические срезы опухоли CloudmanS91, окрашенной с помощью макрофагального маркера F4/80. Как показано на **фиг. 17B** и **18B**, лечение ингибитором анти-PD-1 и изоформно-специфичным ингибитором TGFb1 повышало инфильтрацию CD8+ Т-клеток и инфильтрацию макрофагов в опухоли S91.

Пример 14: Воздействие pH на связывание Ab2 с proTGFb1 C4S

[744] FORTEBIO® OCTET® Red384 использовали для тестирования pH-чувствительности Ab2 (человеческий IgG4) и эталонного антитела в качестве контроля («R1») (человеческий IgG4), которое также является изоформно-селективным ингибитором TGFβ1, который связывает латентный комплекс pH-нечувствительным (pH-независимым) образом. Антитела тестировали в отношении иммобилизованного на датчике человеческого proTGFβ1 C4S, который содержит мутацию в продомене для облегчения экспрессии proTGFβ1, без дисульфидной связи с презентирующей молекулой. В этом эксперименте использовали полистироловые 96-луночные черные планшеты с половинным объемом лунок (Greiner BIO-One®) и биосенсоры (FortéBio) второго поколения, реагирующие с аминами (AR2G).

[745] Набор реагентов второго поколения, реагирующих с аминами (AR2G) (FortéBio, номер по каталогу 18-5095), использовали в соответствии со спецификациями производителя для оценки pH-чувствительности связывания Ab2 и R1 с человеческим proTGFβ1 C4S. AR2G-биосенсоры сначала гидратировали в воде в автономном режиме в течение не менее 10 минут перед началом эксперимента. После начала эксперимента наконечники AR2G уравновешивали в воде в течение 1 минуты. Затем наконечники помещали в активирующий раствор на 5 минут. Активирующий раствор состоит из 18 частей воды, 1 части 400 мМ EDC (1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида гидрохлорида) и 1 части 200 мМ s-NHS (N-гидроксисульфосукцинимида). Активирующий раствор готовят непосредственно перед использованием в эксперименте. После активации наконечники на 3 минуты нагружали 10 мкг/мл раствора человеческого proTGFβ1 C4S в 10 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5. После нагрузки наконечники гасили этаноламином, pH 8,5, в течение 15 минут. Затем наконечники оставляли в исходном состоянии/блокировали 20-минутной инкубацией в 1x улучшенном кинетическом буфере. 1x улучшенный кинетический буфер (1xEKB) представляет собой 1x кинетический буфер (FORTEBIO®, номер по каталогу 18-1105, разведенный в 10 раз с помощью ФСБ) с добавлением 2% BSA (Sigma A3059-100G), 0,5 M NaCl (Fisher S671-10) и 0,09% Tween™-20 (P7949-500M). Затем кончикам давали возможность связываться в растворе 10 мкг/мл Ab2 или R1 в 1xEKB (pH 7,3) в течение 10 минут перед последней 10-минутной стадией диссоциации. Диссоциацию проводили в 1xKB при pH 7 и pH 5.

[746] На **фиг. 19** показана кинетика связывания Ab2 и R1 при различных pH. R1 показало минимальную диссоциацию при pH 7 или pH 5 (K_{dis}=4,38e^{-3} и K_{dis}=3,69e^{-3}, соответственно). Ab2 показало некоторую диссоциацию при pH 7 (K_{dis}=2,78e^{-3}). Однако Ab2 показало значительную диссоциацию при pH 5 (K_{dis}=5,61e^{-3}), что указывает на то, что Ab2 является pH-чувствительным.

Пример 15: Антифибротический эффект TGFβ1-селективного ингибитора активации в моделях фиброза на мышах

[747] Модель фиброза печени, вызванного диетой с дефицитом холина и высоким содержанием жиров (CDHFD), которая повторяет аспекты состояний ожирения печени, использовали у мышей для изучения эффектов Ab2. Фиброз индуцировали путем кормления мышей в течение 12 недель диетой с дефицитом холина и высоким содержанием жиров (CDHFD). Лечение антителами начинали через четыре недели после индуцирования фиброза и продолжали в течение восьми недель. Исследование повторяли дважды, как показано на **фиг. 20** (исследование 1, левый график, и исследование 2, правый график). На **фиг. 20** обощены данные из обоих исследований.

[748] Антифибротический эффект Ab2 наблюдали в обоих исследованиях, о чем свидетельствует уменьшение площади фиброзной ткани, показанное окрашиванием пикросириусом красным (PSR) (**фиг. 21**). Наблюдаемый антифибротический эффект Ab2 согласуется с другими параметрами фиброза, используемыми для оценки фиброза, включая снижение содержания гидроксипролина («HYP») (**фиг. 22**) и уменьшение окрашивания коллагена I типа («Col1») по количественной IHC (**фиг. 23**). Кроме того, вместе с предыдущими данными (UUO, CCl4, Альпорт), которые продемонстрировали антифибротическую эффективность Ab2, эти результаты показывают воспроизводимую активность Ab2 *in vivo*, в этих доклинических моделях фиброза на мышах.

[749] Для определения активности Ab46 *in vivo* было проведено исследование взаимодействия мышей на CDHFD с мишенью. Мышей кормили диетой CDHF в течение десяти недель. Первую дозу Ab46 (3, 10 и 30 мг/кг) или отрицательный контроль («HuNEG» IgG4, 30 мг/кг) вводили в день 1 и день 3. Сбор тканей проводили в день 5. На **фиг. 28** представлен график, показывающий отношения фосфорилированных к общим SMAD2/3 в медиальной доле печени мышей на CDHFD, измеренные с помощью ELISA. Значительное снижение pSMAD2/3 наблюдали в медиальной доле при всех протестированных дозах Ab46 ($p<0,05$ (t-критерий)). Данные показывают, что Ab46 эффективно снижает активность сигнального пути TGFβ у животных в модели CDHFD-индуцированного фиброза печени. На **фиг. 29** представлен график, показывающий процентную долю (%) положительных по фосфо-SMAD2 (pSMAD2) ядер в левой латеральной доле мышей, описанных выше. Значительное снижение % положительных по pSMAD2 ядер наблюдали у мышей, получавших дозу Ab46 30 мг/кг. Таким образом, эти результаты показывают, что значительная часть pSMAD2-сигнализации управляется изоформой TGFβ1. Наконец, снижение % pSMAD2-ядер было больше в печени мышей после 10 недель CDHFD, получавших Ab46, по сравнению с сопоставимыми дозами Ab2 (данные не показаны), что

подтверждает мнение, что изоформно-селективные ингибиторы с более низкой скоростью распада могут обеспечивать усиление активности *in vivo* по сравнению с антителами с более высокой скоростью распада.

[750] Аналогичное исследование было проведено на самцах крыс Wistar-Han в возрасте 10-12 следующим образом: крыс кормили диетой CDHF в течение 12 недель и затем рандомизировали. Первую дозу отрицательного контроля («HuNEG» IgG4, 30 мг/кг, n=6) или Ab46 (3, 10 и 30 мг/кг, n=8) вводили в день 1, а вторую дозу вводили в день 3. Лечение ингибитором киназы-рецептора TGF-β типа 1 (ALK5) (ALK5i, 10 мг/кг) использовали в качестве положительного контроля. Сбор тканей (левая латеральная доля) проводили в день 5. Все крысы характеризовались детектируемым содержанием антител в сыворотке. Как показано на **фиг. 30**, все уровни дозы Ab46 способны подавлять фосфорилирование SMAD2. Как наблюдали в исследовании на мышах, снижение процентной доли pSMAD2-положительных ядер было больше для Ab46, чем для Ab2. Исследование повторяли с более широким диапазоном доз: крыс кормили диетой CDHF в течение 12 недель и затем рандомизировали. Однократную дозу Ab46 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг или 30 мг/кг вводили в день 1, и через 48 часов проводили сбор тканей. Как показано на **фиг. 31**, для доз 10 мг/кг и 30 мг/кг наблюдали значительное уменьшение количества pSMAD2-положительных ядер, сравнимое с подавлением, наблюдаемым в положительном контроле (ALK5i).

Пример 16: Антифибротический эффект TGFβ1-селективного ингибитора активации в модели фиброза на крысах

[751] Чтобы проверить, могут ли антифибротические эффекты, наблюдаемые с Ab2, быть воспроизведены у других видов, использовали модель фиброза почек на крысах. Введение аденина крысам вызывало быстрый и агрессивный фиброз в почках. Как показано на **фиг. 24**, Ab2, а также два положительных контроля (нейтрализующее антитело 1D11 и низкомолекулярный антагонист ALK5) показали значительные антифибротические эффекты при измеренниии с помощью PSR.

Пример 17: Профибротические эффекты TGFβ3-селективного ингибитора активации в модели фиброза печени

[752] Печень экспрессирует как изоформу TGFβ1, так и TGFβ3. Чтобы выяснить, будет ли ингибирование обеих изоформ в модели CDHFD дополнительно смягчать фиброз печени, мышам на CDHFD вводили Ab2 (TGFβ1-селективный ингибитор активации) и TGFβ3-селективный ингибитор активации или по отдельности, или в комбинации. У мышей, получавших ингибитор TGFβ3, наблюдали обострение заболевания, о чем свидетельствует анализ PSR и дополнительные гистопатологические анализы (**фиг. 25**).

Как сообщалось ранее, введение аденина вызывало фиброз. Через 12 недель, например в конце исследования, животные, которые получали Ab2, продемонстрировали значительно меньший фиброз по сравнению с получавшими IgG животными (отрицательный контроль). Напротив, животные, получавшие TGFβ3-селективный ингибитор, продемонстрировали значительно больший фиброз с приблизительно 12% положительной по PSR площади. Животные, которые получали комбинацию как TGFβ3-селективного ингибитора, так и TGFβ1-селективного ингибитора (Ab2), продемонстрировали промежуточный уровень фиброза, что указывает на то, что антифибротические эффекты Ab2 ослаблялись ингибированием TGFβ3.

[753] Различные признаки и варианты осуществления настоящего изобретения, упомянутые в отдельных разделах выше, применимы, при необходимости, к другим разделам с соответствующими изменениями. Следовательно, признаки, указанные в одном разделе, могут быть объединены с признаками, указанными в других разделах, по мере необходимости.

[754] Специалисты в данной области определят или смогут выявить, используя не более чем рутинные эксперименты, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем документе. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются нижеследующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1,

причем данный ингибитор представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые селективно ингибируют активацию TGFβ1;

причем данное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают как человеческий LTBP1-proTGFβ1, так и человеческий LTBP3-proTGFβ1 со скоростью одновалентной диссоциации 10,0e-4 (1/c), измеренной с помощью анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR), и, необязательно, с K_D<1,0 нМ; и,

причем данное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат следующие шесть CDR:

i) H-CDR1, содержащий GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

ii) H-CDR2, содержащий ISGSG(X_1)AT, где, необязательно, X_1 представляет собой A или K (SEQ ID NO: 277);

iii) H-CDR3, содержащий VSSG(X_1)WD(X_2)D, где, необязательно, X_1 представляет собой H, D или Q; и где, также необязательно, X_2 представляет собой F или Y (SEQ ID NO: 278);

iv) L-CDR1, содержащий QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2, содержащий AAS(X_1)(X_2)(X_3)(X_4), где, необязательно, X_1 представляет собой N, G или V; где, также необязательно, X_2 представляет собой L, N или E; где, также необязательно, X_3 представляет собой Q или E; и где, также необязательно, X_4 представляет собой S или T (SEQ ID NO: 280); и

vi) L-CDR3, содержащий QQTY(X_1)VPLT, где, необязательно, X_1 представляет собой T или G (SEQ ID NO: 281).

2. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:

i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);

iii) H-CDR3 содержит VSSG(X_1)WD(X_2)D, где, необязательно, X_1 представляет собой H или Q, а X_2 представляет собой Y или F (SEQ ID NO: 283);

iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и

vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

3. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:

i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDFD (SEQ ID NO: 289);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASNLES (SEQ ID NO: 292); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYTVPLT (SEQ ID NO: 296).

4. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDFD (SEQ ID NO: 289);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYTVPLT (SEQ ID NO: 296).

5. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDFD (SEQ ID NO: 289);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASVNES (SEQ ID NO: 293); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYTVPLT (SEQ ID NO: 296).

6. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDFD (SEQ ID NO: 289);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASNEET (SEQ ID NO: 294); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYTVPLT (SEQ ID NO: 296).

7. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDFD (SEQ ID NO: 289);

iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2 содержит AASNLES (SEQ ID NO: 292); и

vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

8. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:

i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);

iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDFD (SEQ ID NO: 289);

iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и

vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

9. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:

i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);

iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287);

iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2 содержит AASNLES (SEQ ID NO: 292); и

vi) L-CDR3 содержит QQTYTVPLT (SEQ ID NO: 296).

10. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:

i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);

iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287);

iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и

vi) L-CDR3 содержит QQTYTVPLT (SEQ ID NO: 296).

11. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:

i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);

iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287);

iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2 содержит AASNLES (SEQ ID NO: 292); и

vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

12. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

13. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGDWDYD (SEQ ID NO: 290);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASNLES (SEQ ID NO: 292); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

14. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGDWDYD (SEQ ID NO: 290);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

15. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGQWDYD (SEQ ID NO: 291);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASNLES (SEQ ID NO: 292); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

16. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:

i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);

iii) H-CDR3 содержит VSSGQWDYD (SEQ ID NO: 291);

iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и

vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

17. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:

i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

ii) H-CDR2 содержит ISGSGKAT (SEQ ID NO: 288);

iii) H-CDR3 содержит VSSGDWDYD (SEQ ID NO: 290);

iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2 содержит AASNLQS (SEQ ID NO: 295); и

vi) L-CDR3 содержит QQTYTVPLT (SEQ ID NO: 296).

18. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:

i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

ii) H-CDR2 содержит ISGSGKAT (SEQ ID NO: 288);

iii) H-CDR3 содержит VSSGDWDYD (SEQ ID NO: 290);

iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и

vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

19. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:

i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);

iii) H-CDR3 содержит VSSG(H/D/Q)WD(F/Y)D (SEQ ID NO: 278);

iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2 содержит AAS(G/N)LES (SEQ ID NO: 303); и

vi) L-CDR3 содержит QQTY(G/T)VPLT (SEQ ID NO: 281).

20. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1, причем данный способ предусматривает стадии:

i) выбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые селективно связывают человеческий латентный комплекс TGFβ1 с субнаномолярной аффинностью

(K_D<1,0 нМ) и со скоростью диссоциации <10×10^{-4} (k_{OFF}<10,0E-4) по измерениям с помощью анализа связывания с Fab-фрагментами *in vitro* (например, способа на основе BLI или SPR) и ингибируют активацию TGFβ1 в клеточном анализе активности;

ii) получения антитела или генноинженерной конструкции, содержащей антигенсвязывающий фрагмент данного антитела, в клеточной культуре, причем, необязательно, данная клеточная культура представляет собой культуру клеток млекопитающих и причем, также необязательно, данная клеточная культура характеризуется объемом ≥250 л;

iii) включения данного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в фармацевтическую композицию, содержащую данный ингибитор и фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

21. Способ по п. 20, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают человеческий LTBP1-proTGFβ1 или человеческий LTBP3-proTGFβ1.

22. Способ по п. 20, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают человеческий LTBP1-proTGFβ1, человеческий LTBP3-proTGFβ1, человеческий GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1.

23. Фармацевтическая композиция, получаемая с помощью способа по любому из пп. 20-22.

24. Изоформно-селективный ингибитор TGFβ1 по любому из пп. 1-19 для применения в лечении фиброзного нарушения у субъекта.

25. Изоформно-селективный ингибитор TGFβ1 по любому из пп. 1-19 для применения в способе снижения уровней циркулирующего латентного TGFβ у субъекта.

26. Изоформно-селективный ингибитор TGFβ1 по п. 25, причем уровень циркулирующего латентного TGFβ определяют в образце, полученном от субъекта.

27. Изоформно-селективный ингибитор TGFβ1 по п. 26, причем образец представляет собой образец цельной крови или компонент крови.

28. Изоформно-селективный ингибитор TGFβ1 по п. 25, причем циркулирующий латентный TGFβ представляет собой циркулирующий латентный TGFβ1.

29. Применение изоформно-селективного ингибитора TGFβ1 по любому из пп. 1-19 в производстве лекарственного средства, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

30. Способ лечения заболевания, связанного с дисрегуляцией внеклеточного матрикса (ECM) у субъекта, причем данный способ предусматривает стадии:

выбора ингибитора TGFβ, который ингибирует TGFβ1, но не ингибирует один или оба из TGFβ2 и/или TGFβ3;

введения субъекту с заболеванием, связанным с дисрегуляцией ECM, ингибитора TGFβ в количестве, эффективном для лечения данного заболевания, причем, необязательно, данное заболевание представляет собой фиброз или рак, где, также необязательно, рак включает солидную опухоль или рак представляет собой миелопролиферативное нарушение.

31. Способ лечения фиброза у субъекта, причем данный способ предусматривает стадии

выбора ингибитора TGFβ, который ингибирует TGFβ1, но не ингибирует один или оба из TGFβ2 и TGFβ3;

введения субъекту с фиброзным состоянием ингибитора TGFβ в количестве, эффективном для лечения данного фиброзного состояния.

32. Способ по п. 31, причем фиброзное состояние представляет собой фиброз печени, фиброз почек, фиброз сердца или фиброз легких.

33. Способ по п. 32, причем фиброзное состояние представляет собой фиброз печени, связанный с NASH.

34. Способ по п. 33, причем фиброз печени представляет собой фиброз стадии 3 или стадии 4.

35. Способ по п. 31, дополнительно содержащий стадии:

(i) определения уровней циркулирующего латентного TGFβ у субъекта до введения ингибитора TGFβ; и

(ii) определения уровней циркулирующего латентного TGFβ у субъекта после введения ингибитора TGFβ,

причем повышение уровня циркулирующего латентного TGFβ после введения ингибитора по сравнению с циркулирующим латентным TGFβ до введения указывает на терапевтическую эффективность.

36. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые селективно ингибируют активацию TGFβ1, содержащие:

определяющий комплементарность участок 1 (CDRH1) тяжелой цепи, содержащий GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

определяющий комплементарность участок 2 (CDRH2) тяжелой цепи, содержащий ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);

определяющий комплементарность участок 3 (CDRH3) тяжелой цепи, содержащий VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287);

определяющий комплементарность участок 1 (CDRL1) легкой цепи, содержащий QSISSY (SEQ ID NO: 279);

определяющий комплементарность участок 2 (CDRL2) легкой цепи, содержащий AASGLES (SEQ ID NO: 284); и,

определяющий комплементарность участок 3 (CDRL3) легкой цепи, содержащий QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

37. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), причем данный VH содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью по меньшей мере 95% с EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGAAT YFADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSSGHWDYDYWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO: 297), и причем данный VL содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью по меньшей мере 95% с DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASGLESGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYGVPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 298).

38. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 36 или п. 37, в которых VH содержит EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGAAT YFADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSSGHWDYDYWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO: 297) и в которых VL содержит DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASGLESGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYGVPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 298).

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ (СТАТЬЯ 34 PCT)

1. Изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1,

причем данный ингибитор представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые селективно ингибируют активацию TGFβ1;

причем данное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают как человеческий LTBP1-proTGFβ1, так и человеческий LTBP3-proTGFβ1 со скоростью одновалентной диссоциации 10,0e-4 (1/c) или меньше, измеренной с помощью анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR), и с K_D<1,0 нМ; и,

причем данное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат следующие шесть CDR:

i) H-CDR1, содержащий GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

ii) H-CDR2, содержащий ISGSG(X_1)AT, где, необязательно, X_1 представляет собой A или K (SEQ ID NO: 277);

iii) H-CDR3, содержащий VSSG(X_1)WD(X_2)D, где, необязательно, X_1 представляет собой H, D или Q; и где, также необязательно, X_2 представляет собой F или Y (SEQ ID NO: 278);

iv) L-CDR1, содержащий QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2, содержащий AAS(X_1)(X_2)(X_3)(X_4), где, необязательно, X_1 представляет собой N, G или V; где, также необязательно, X_2 представляет собой L, N или E; где, также необязательно, X_3 представляет собой Q или E; и где, также необязательно, X_4 представляет собой S или T (SEQ ID NO: 280); и

vi) L-CDR3, содержащий QQTY(X_1)VPLT, где, необязательно, X_1 представляет собой T или G (SEQ ID NO: 281).

2. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:

i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);

iii) H-CDR3 содержит VSSG(X_1)WD(X_2)D, где, необязательно, X_1 представляет собой H или Q, а X_2 представляет собой Y или F (SEQ ID NO: 283);

iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и

vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

3. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDFD (SEQ ID NO: 289);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASNLES (SEQ ID NO: 292); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYTVPLT (SEQ ID NO: 296).

4. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDFD (SEQ ID NO: 289);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYTVPLT (SEQ ID NO: 296).

5. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDFD (SEQ ID NO: 289);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASVNES (SEQ ID NO: 293); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYTVPLT (SEQ ID NO: 296).

6. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDFD (SEQ ID NO: 289);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASNEET (SEQ ID NO: 294); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYTVPLT (SEQ ID NO: 296).

7. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);

iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDFD (SEQ ID NO: 289);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASNLES (SEQ ID NO: 292); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

8. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDFD (SEQ ID NO: 289);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

9. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASNLES (SEQ ID NO: 292); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYTVPLT (SEQ ID NO: 296).

10. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYTVPLT (SEQ ID NO: 296).

11. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASNLES (SEQ ID NO: 292); и

vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

12. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

13. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGDWDYD (SEQ ID NO: 290);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASNLES (SEQ ID NO: 292); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

14. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGDWDYD (SEQ ID NO: 290);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

15. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:
i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);
ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);
iii) H-CDR3 содержит VSSGQWDYD (SEQ ID NO: 291);
iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);
v) L-CDR2 содержит AASNLES (SEQ ID NO: 292); и
vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

16. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:

i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);

iii) H-CDR3 содержит VSSGQWDYD (SEQ ID NO: 291);

iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и

vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

17. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:

i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

ii) H-CDR2 содержит ISGSGKAT (SEQ ID NO: 288);

iii) H-CDR3 содержит VSSGDWDYD (SEQ ID NO: 290);

iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2 содержит AASNLQS (SEQ ID NO: 295); и

vi) L-CDR3 содержит QQTYTVPLT (SEQ ID NO: 296).

18. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:

i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

ii) H-CDR2 содержит ISGSGKAT (SEQ ID NO: 288);

iii) H-CDR3 содержит VSSGDWDYD (SEQ ID NO: 290);

iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2 содержит AASGLES (SEQ ID NO: 284); и

vi) L-CDR3 содержит QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

19. Изоформно-селективный ингибитор по п. 1, в котором:

i) H-CDR1 содержит GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

ii) H-CDR2 содержит ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);

iii) H-CDR3 содержит VSSG(H/D/Q)WD(F/Y)D (SEQ ID NO: 278);

iv) L-CDR1 содержит QSISSY (SEQ ID NO: 279);

v) L-CDR2 содержит AAS(G/N)LES (SEQ ID NO: 303); и

vi) L-CDR3 содержит QQTY(G/T)VPLT (SEQ ID NO: 281).

20. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей изоформно-селективный ингибитор активации TGFβ1, причем данный способ предусматривает стадии:

i) выбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые селективно связывают человеческий латентный комплекс TGFβ1 с субнаномолярной аффинностью

(K_D<1,0 нМ) и со скоростью одновалентной диссоциации 10,0E-4 или меньше по измерениям с помощью анализа связывания *in vitro,* причем анализ связывания *in vitro* представляет собой анализ на основе интерферометрии биослоев (BLI) или анализ на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с Fab-фрагментами, и ингибируют активацию TGFβ1 в клеточном анализе активности;

ii) получения антитела или генноинженерной конструкции, содержащей антигенсвязывающий фрагмент данного антитела, в клеточной культуре, причем, необязательно, данная клеточная культура представляет собой культуру клеток млекопитающих и причем, также необязательно, данная клеточная культура характеризуется объемом ≥250 л;

iii) включения данного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в фармацевтическую композицию, содержащую данный ингибитор и фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

21. Способ по п. 20, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают человеческий LTBP1-proTGFβ1 или человеческий LTBP3-proTGFβ1.

22. Способ по п. 20, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают человеческий LTBP1-proTGFβ1, человеческий LTBP3-proTGFβ1, человеческий GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1.

23. Фармацевтическая композиция, получаемая с помощью способа по любому из пп. 20-22.

24. Изоформно-селективный ингибитор TGFβ1 по любому из пп. 1-19 для применения в лечении фиброзного нарушения у субъекта.

25. Изоформно-селективный ингибитор TGFβ1 по любому из пп. 1-19 для применения в способе снижения уровней циркулирующего латентного TGFβ у субъекта.

26. Изоформно-селективный ингибитор TGFβ1 по п. 25, причем уровень циркулирующего латентного TGFβ определяют в образце, полученном от субъекта.

27. Изоформно-селективный ингибитор TGFβ1 по п. 26, причем образец представляет собой образец цельной крови или компонент крови.

28. Изоформно-селективный ингибитор TGFβ1 по п. 25, причем циркулирующий латентный TGFβ представляет собой циркулирующий латентный TGFβ1.

29. Применение изоформно-селективного ингибитора TGFβ1 по любому из пп. 1-19 в производстве лекарственного средства, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

30. Изоформно-селективный ингибитор по любому из пп.1-19, или фармацевтическая композиция по п.23, для применения в лечении заболевания, связанного с дисрегуляцией внеклеточного матрикса (ECM) у субъекта, причем, необязательно, данное заболевание представляет собой фиброз.

31. Изоформно-селективный ингибитор по любому из пп.1-19, или фармацевтическая композиция по п.23, для применения в лечении фиброзного состояния у субъекта.

32. Изоформно-селективный ингибитор для применения по п. 31, причем фиброзное состояние представляет собой фиброз печени, фиброз почек, фиброз сердца или фиброз легких.

33. Изоформно-селективный ингибитор для применения по п. 32, причем фиброзное состояние представляет собой фиброз печени, связанный с NASH.

34. Изоформно-селективный ингибитор для применения по п. 33, причем фиброз печени представляет собой фиброз стадии 3 или стадии 4.

35. Изоформно-селективный ингибитор для применения по п. 31, дополнительно содержащий стадии:

(i) определения уровней циркулирующего латентного TGFβ у субъекта до введения ингибитора TGFβ; и

(ii) определения уровней циркулирующего латентного TGFβ у субъекта после введения ингибитора TGFβ,

причем повышение уровня циркулирующего латентного TGFβ после введения ингибитора по сравнению с циркулирующим латентным TGFβ до введения указывает на терапевтическую эффективность.

36. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают каждый из человеческих LTBP1-proTGFβ1 и/или человеческих LTBP3-proTGFβ1, содержащие:

определяющий комплементарность участок 1 (CDRH1) тяжелой цепи, содержащий GFTFADYA (SEQ ID NO: 276);

определяющий комплементарность участок 2 (CDRH2) тяжелой цепи, содержащий ISGSGAAT (SEQ ID NO: 282);

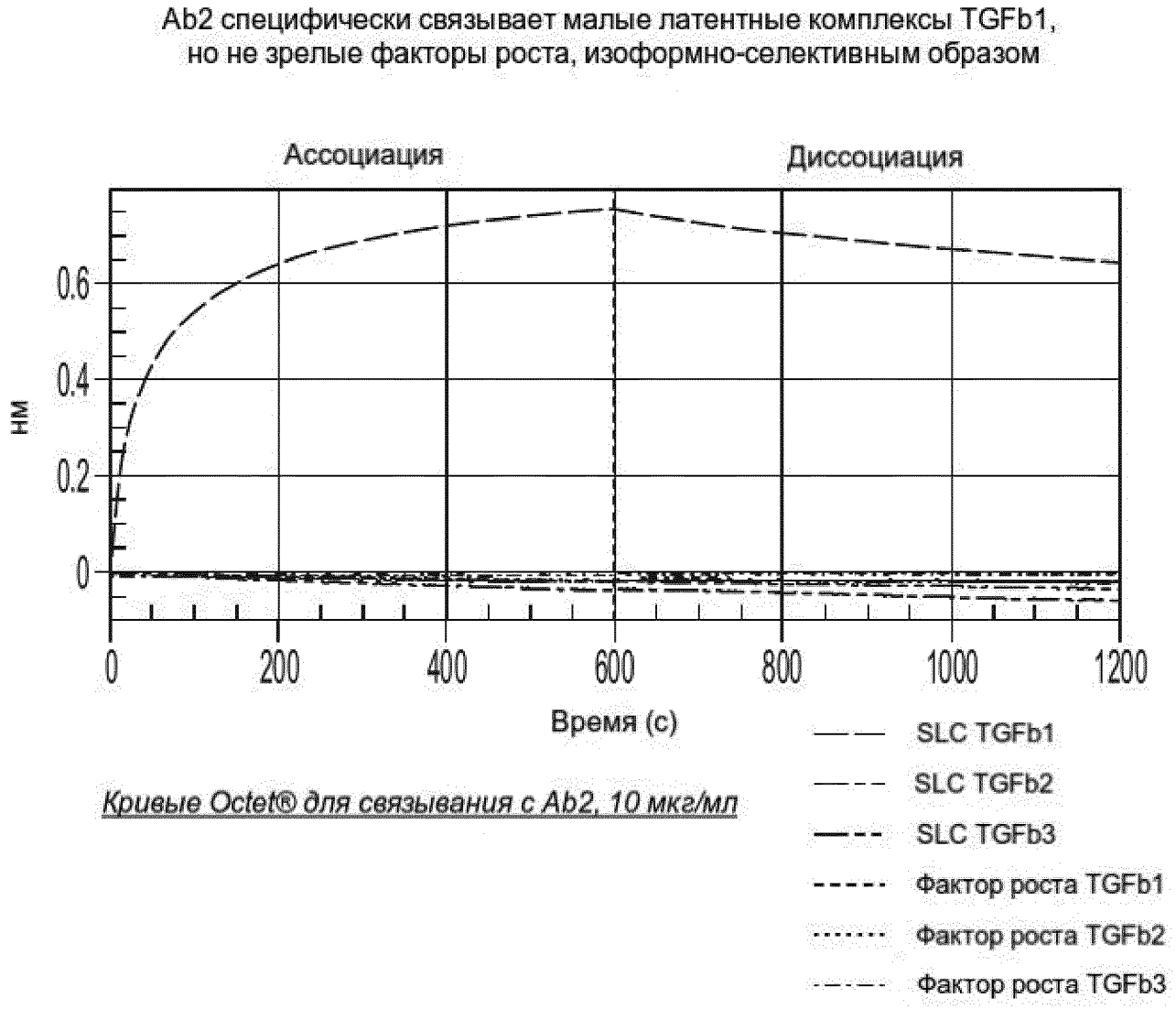
определяющий комплементарность участок 3 (CDRH3) тяжелой цепи, содержащий VSSGHWDYD (SEQ ID NO: 287);

определяющий комплементарность участок 1 (CDRL1) легкой цепи, содержащий QSISSY (SEQ ID NO: 279);

определяющий комплементарность участок 2 (CDRL2) легкой цепи, содержащий AASGLES (SEQ ID NO: 284); и,

определяющий комплементарность участок 3 (CDRL3) легкой цепи, содержащий QQTYGVPLT (SEQ ID NO: 285).

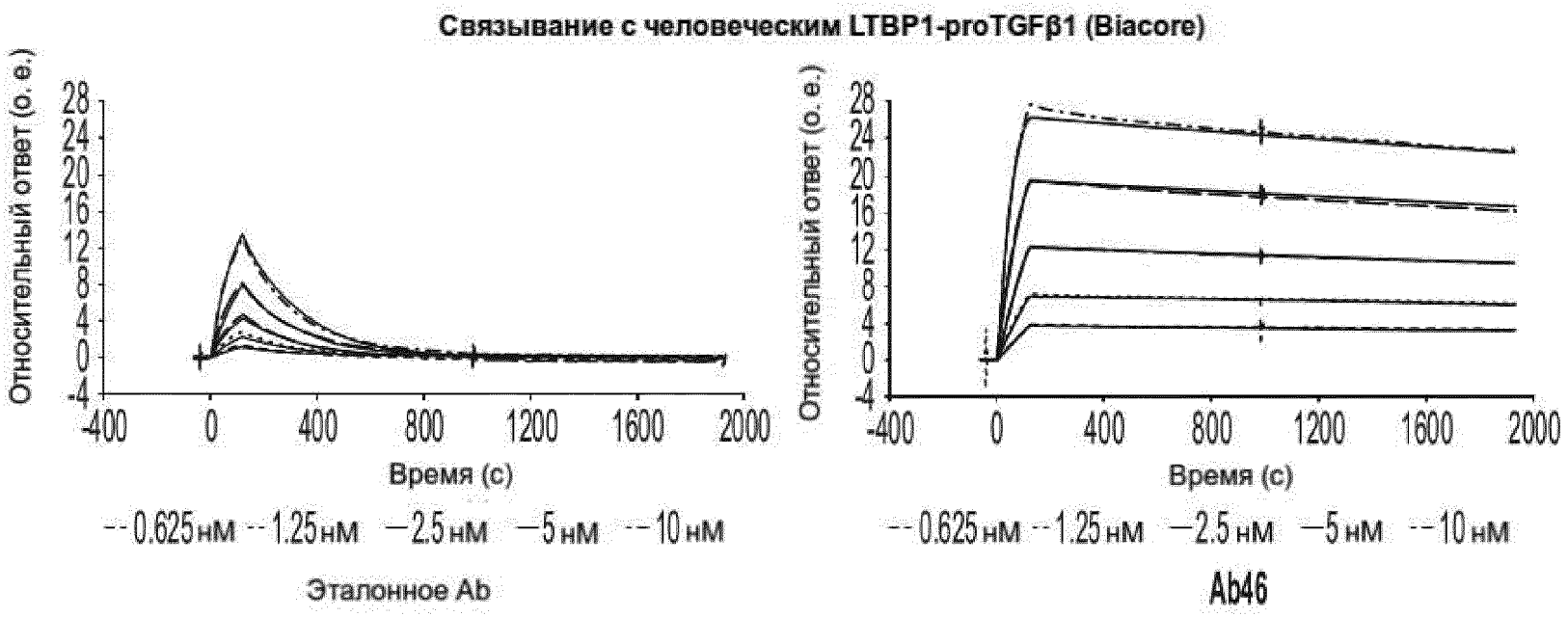
37. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 36, в которых VH содержит EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGAAT YFADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSSGHWDYDYWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO: 297) и в которых VL содержит DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASGLESGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYGVPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 298).



Кривые Octet® для связывания с Ab2, 10 мкг/мл

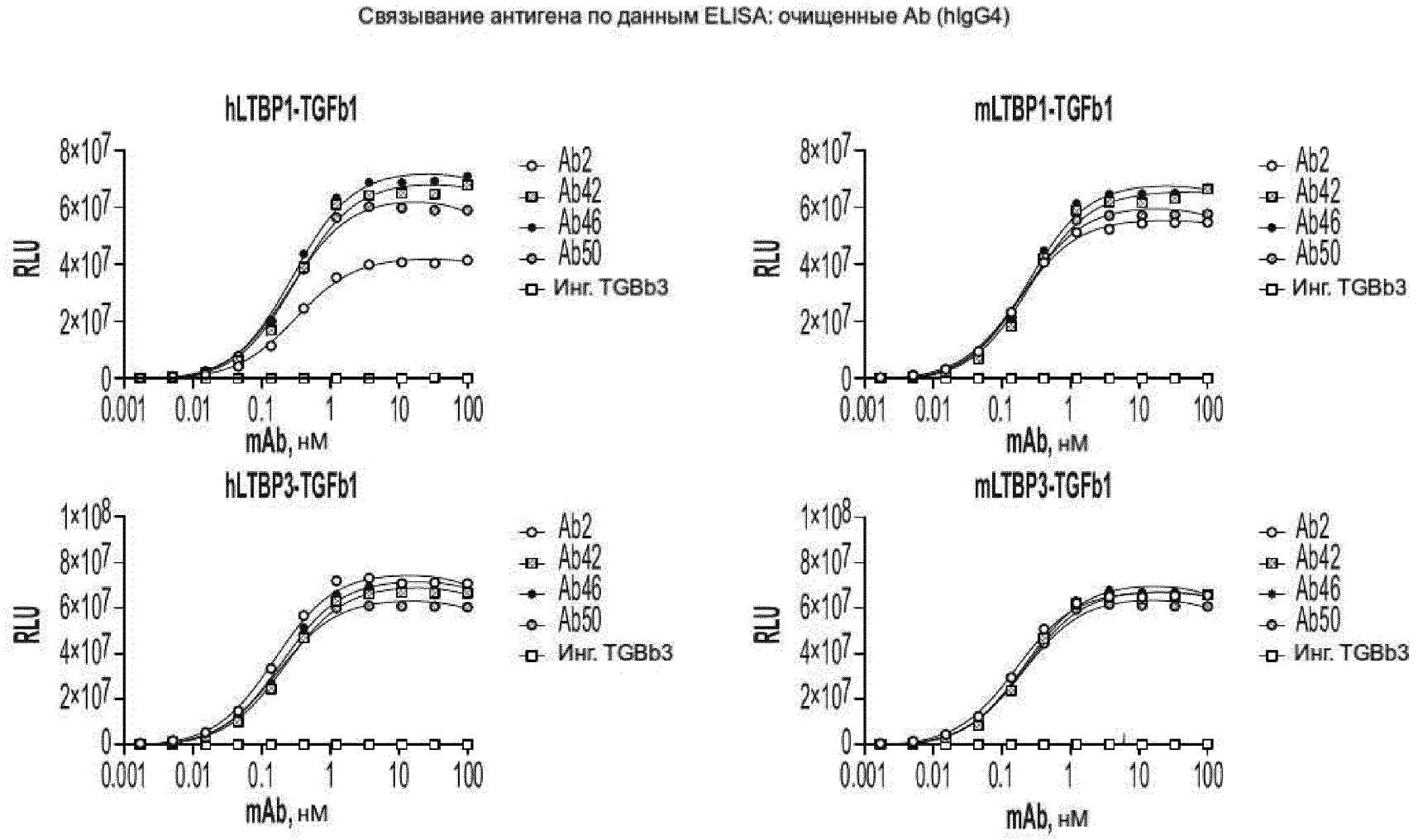
Фиг. 1

Fab Ab46 характеризуется большей аффинностью и меньшей скоростью диссоциации, чем Fab эталонного Ab, по данным SPR

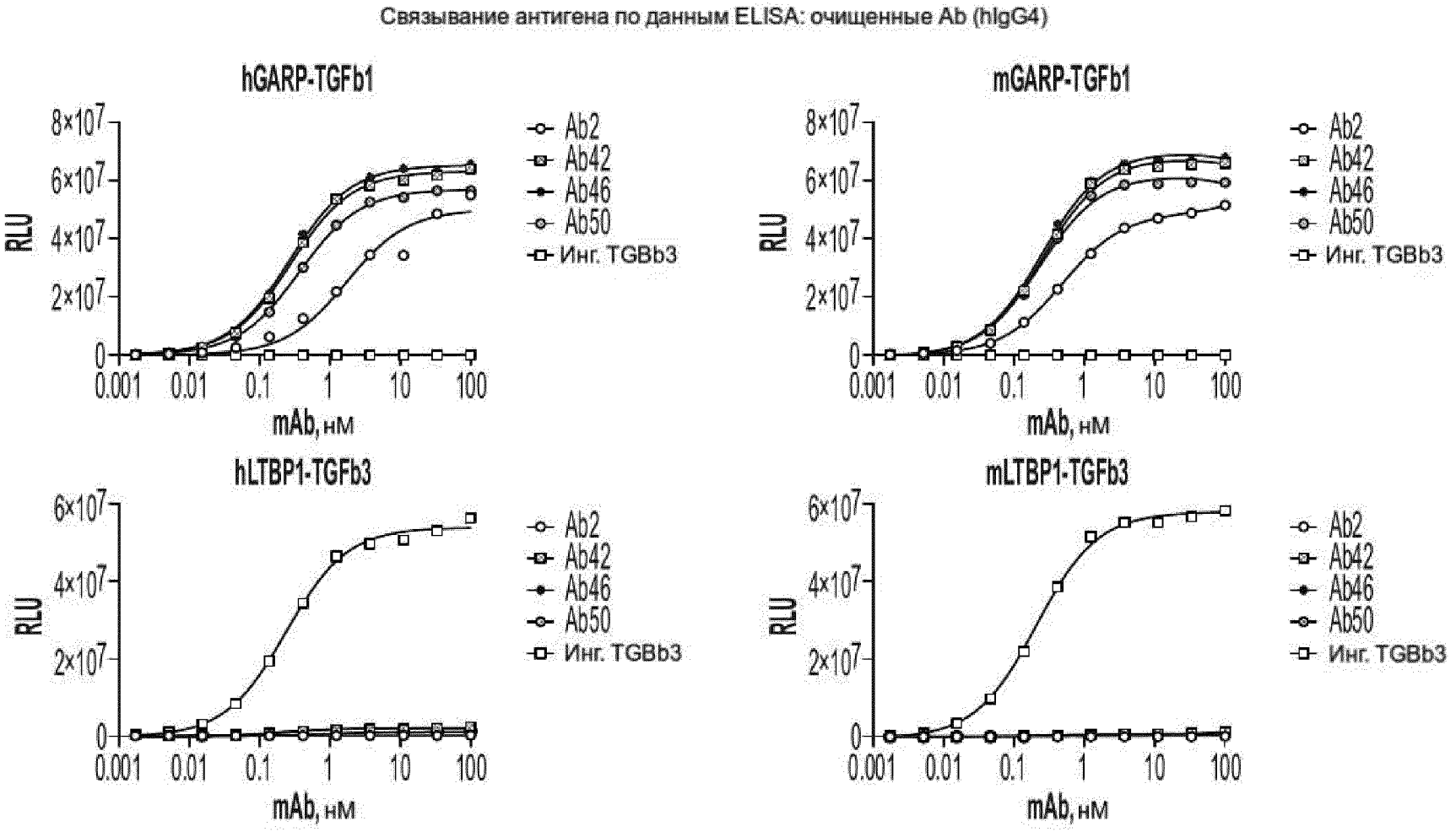


Антитело (Fab)	k_{on} (M^{-1}/c^{-1})	k_{off} (c^{-1})	$t_{1/2}$ (мин)	K_D
Ref Ab	7.18e+5	4.83e-3	2.4	6.73 нМ
Ab46	1.75e+6	8.81e-5	131	50.2 пМ
Кратная разница	2.4	55	55	134

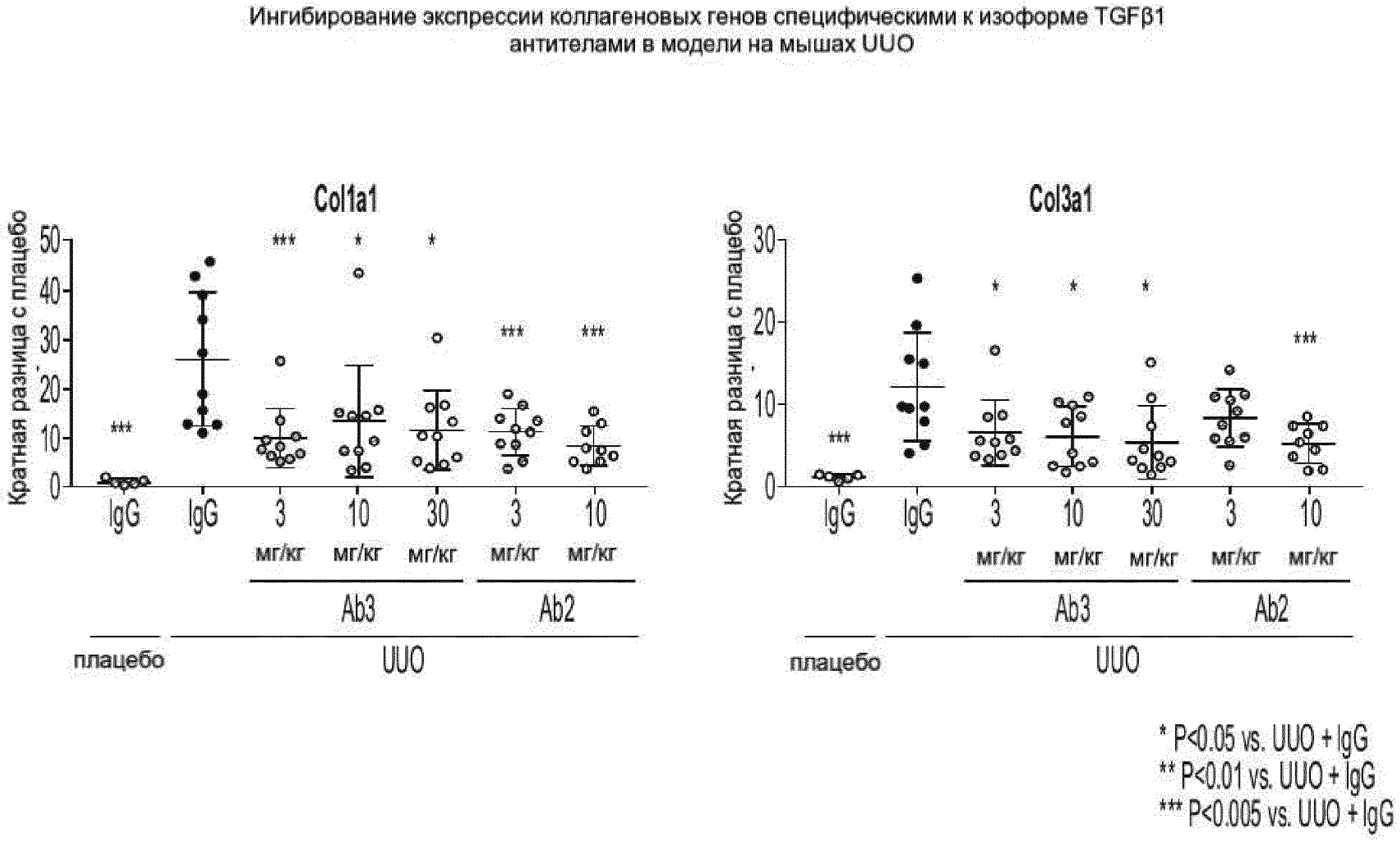
Фиг. 2


Связывание антигена по данным ELISA: очищенные Ab (hIgG4)
hLTBP1-TGFb1
mLTBP1-TGFb1
hLTBP3-TGFb1
mLTBP3-TGFb1
RLU
mAb, нм
Ab2
Ab42
Ab46
Ab50
Инг. TGBb3

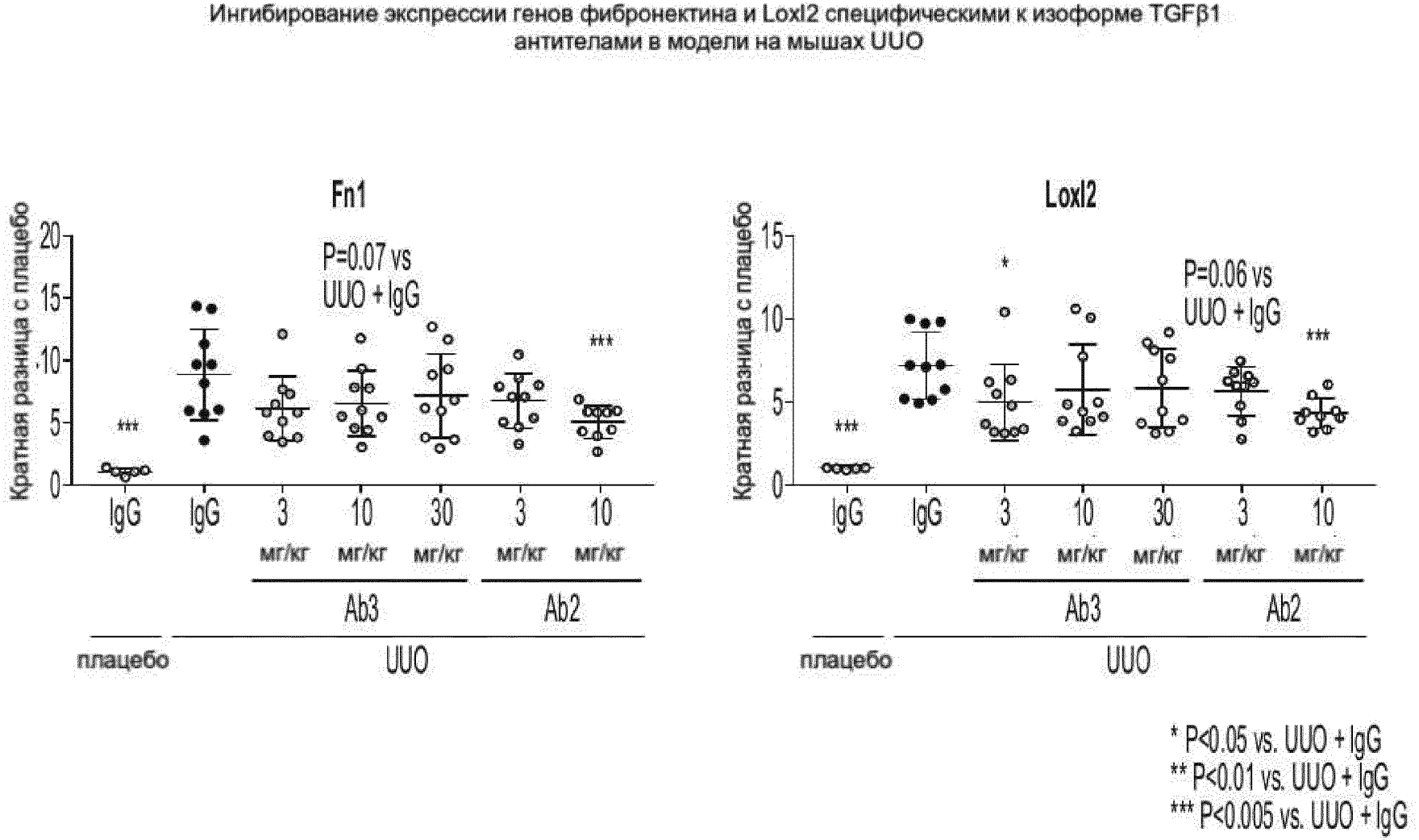
Фиг. 3


Связывание антигена по данным ELISA: очищенные Ab (hIgG4)
hGARP-TGFb1
mGARP-TGFb1
hLTBP1-TGFb3
mLTBP1-TGFb3
RLU
mAb, нМ
Ab2
Ab42
Ab46
Ab50
Инг. TGBb3

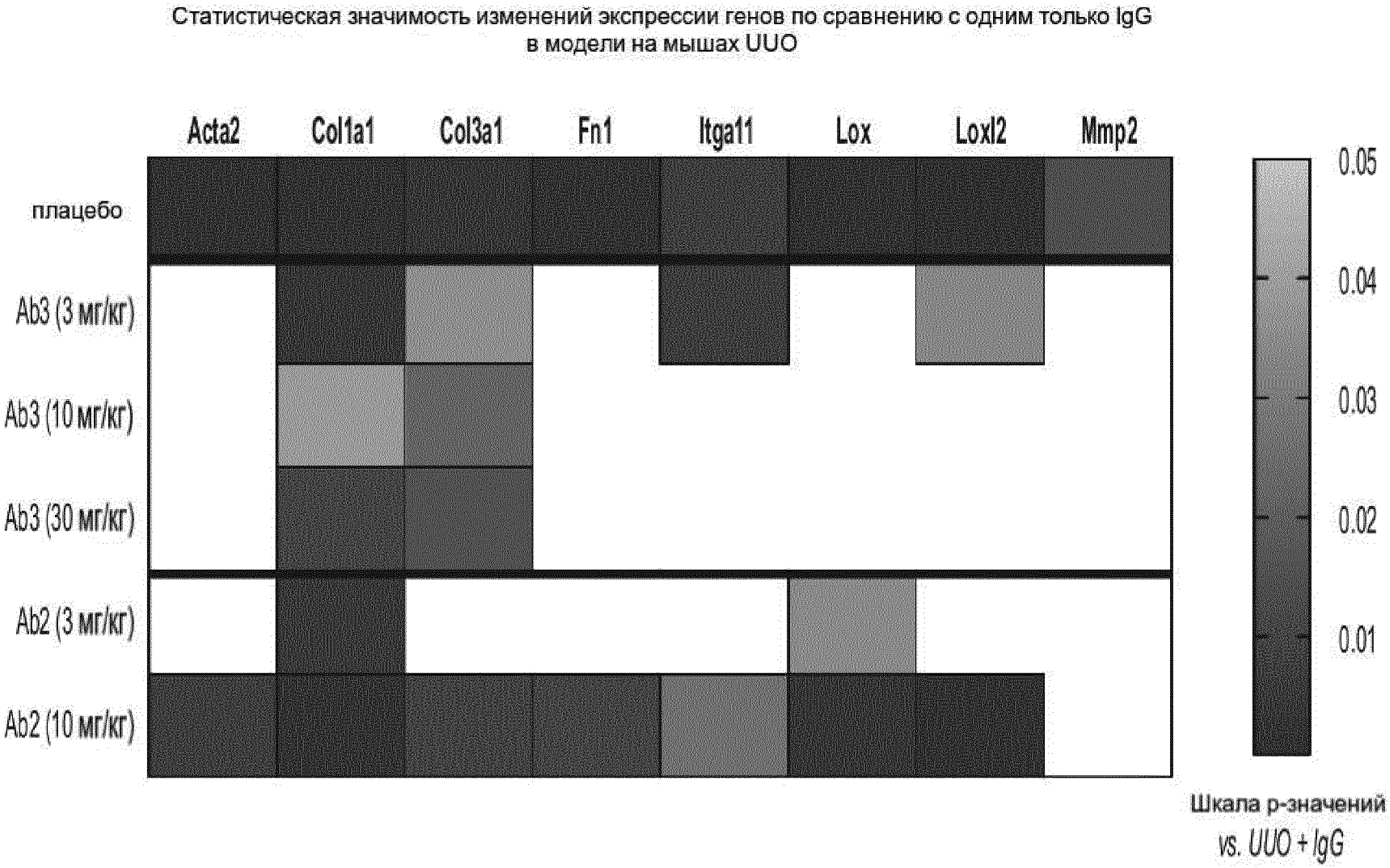
Фиг. 4


Ингибирование экспрессии коллагеновых генов специфическими к изоформе TGFβ1 антителами в модели на мышах UUO
Col1a1
Кратная разница с плацебо
50
40
30
20
10
0
***
*
*
***
***
IgG
IgG
3 мг/кг
10 мг/кг
30 мг/кг
3 мг/кг
10 мг/кг
Ab3
Ab2
плацебо
UUO
Col3a1
Кратная разница с плацебо
30
20
10
0
***
*
*
*
***
IgG
IgG
3 мг/кг
10 мг/кг
30 мг/кг
3 мг/кг
10 мг/кг
Ab3
Ab2
плацебо
UUO
* P<0.05 vs. UUO + IgG
** P<0.01 vs. UUO + IgG
*** P<0.005 vs. UUO + IgG

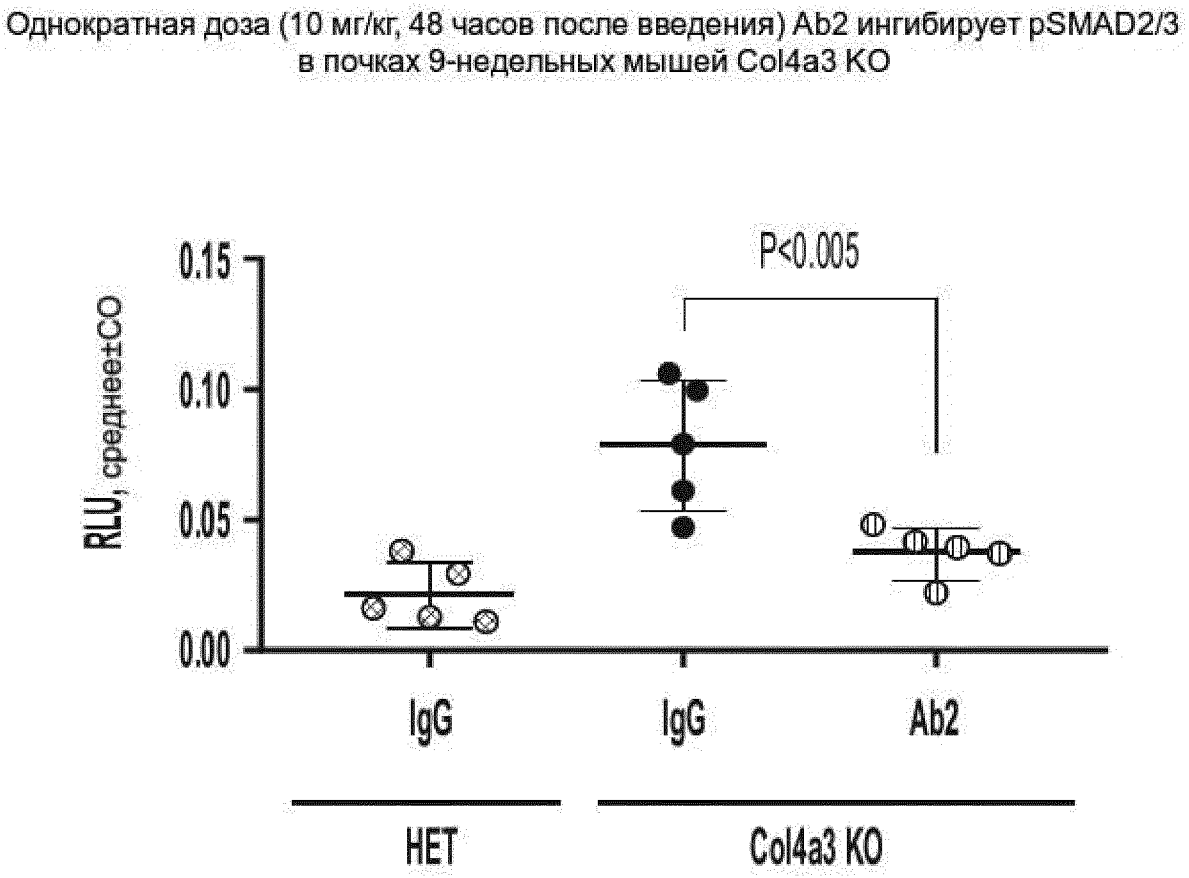
Фиг. 5A


Ингибирование экспрессии генов фибронектина и Loxl2 специфическими к изоформе TGFβ1 антителами в модели на мышах UUO
Fn1
Кратная разница с плацебо
P=0.07 vs UUO + IgG
***
IgG
IgG
3 мг/кг
10 мг/кг
30 мг/кг
3 мг/кг
10 мг/кг
Ab3
Ab2
плацебо
UUO
Loxl2
P=0.06 vs UUO + IgG
*
* P<0.05 vs. UUO + IgG
** P<0.01 vs. UUO + IgG
*** P<0.005 vs. UUO + IgG

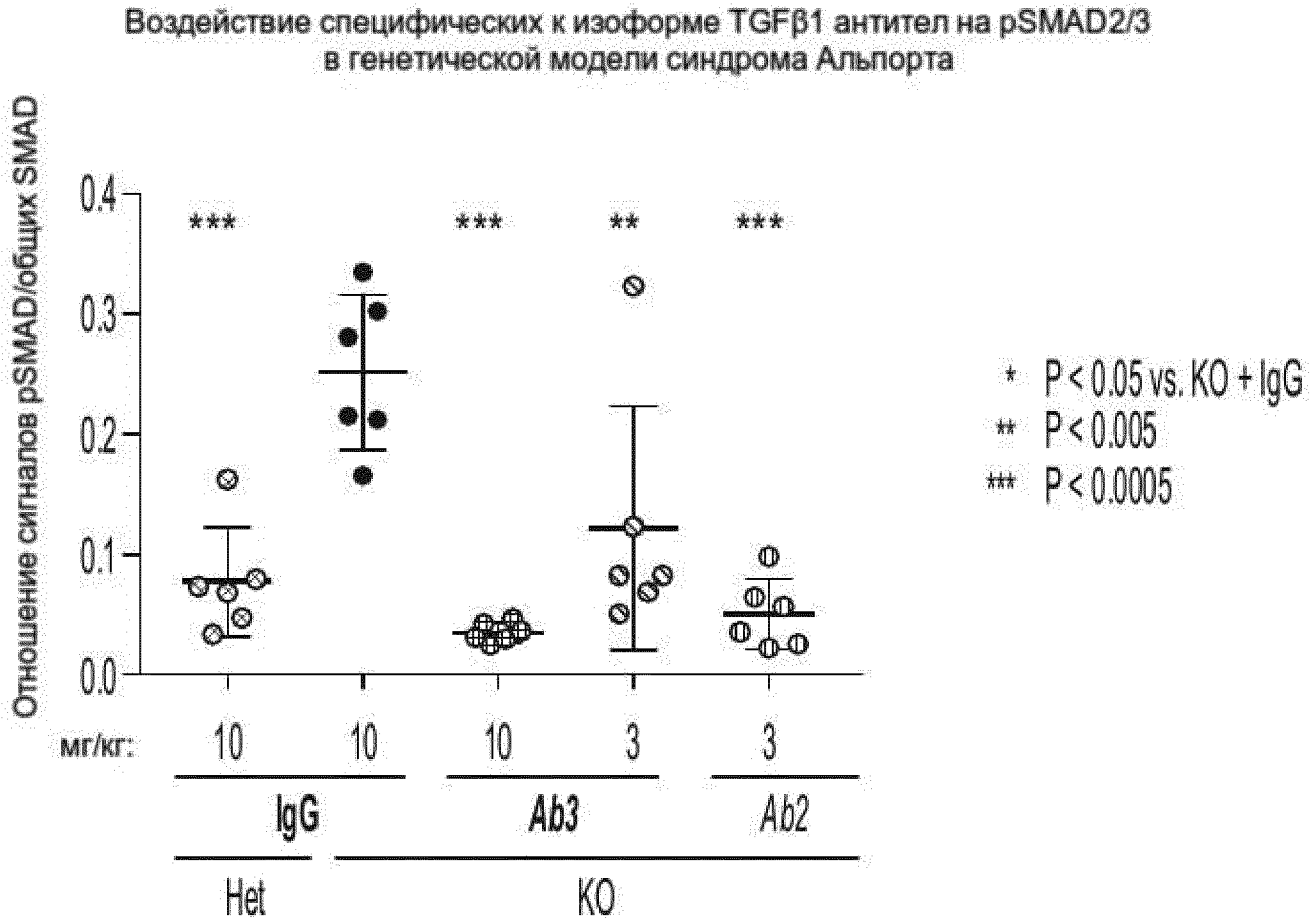
Фиг. 5B


Статистическая значимость изменений экспрессии генов по сравнению с одним только IgG
в модели на мышах UUO
Acta2
Col1a1
Col3a1
Fn1
Itga11
Lox
Loxl2
Mmp2
плацебо
Ab3 (3 мг/кг)
Ab3 (10 мг/кг)
Ab3 (30 мг/кг)
Ab2 (3 мг/кг)
Ab2 (10 мг/кг)
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
Шкала p-значений
vs. UUO + IgG

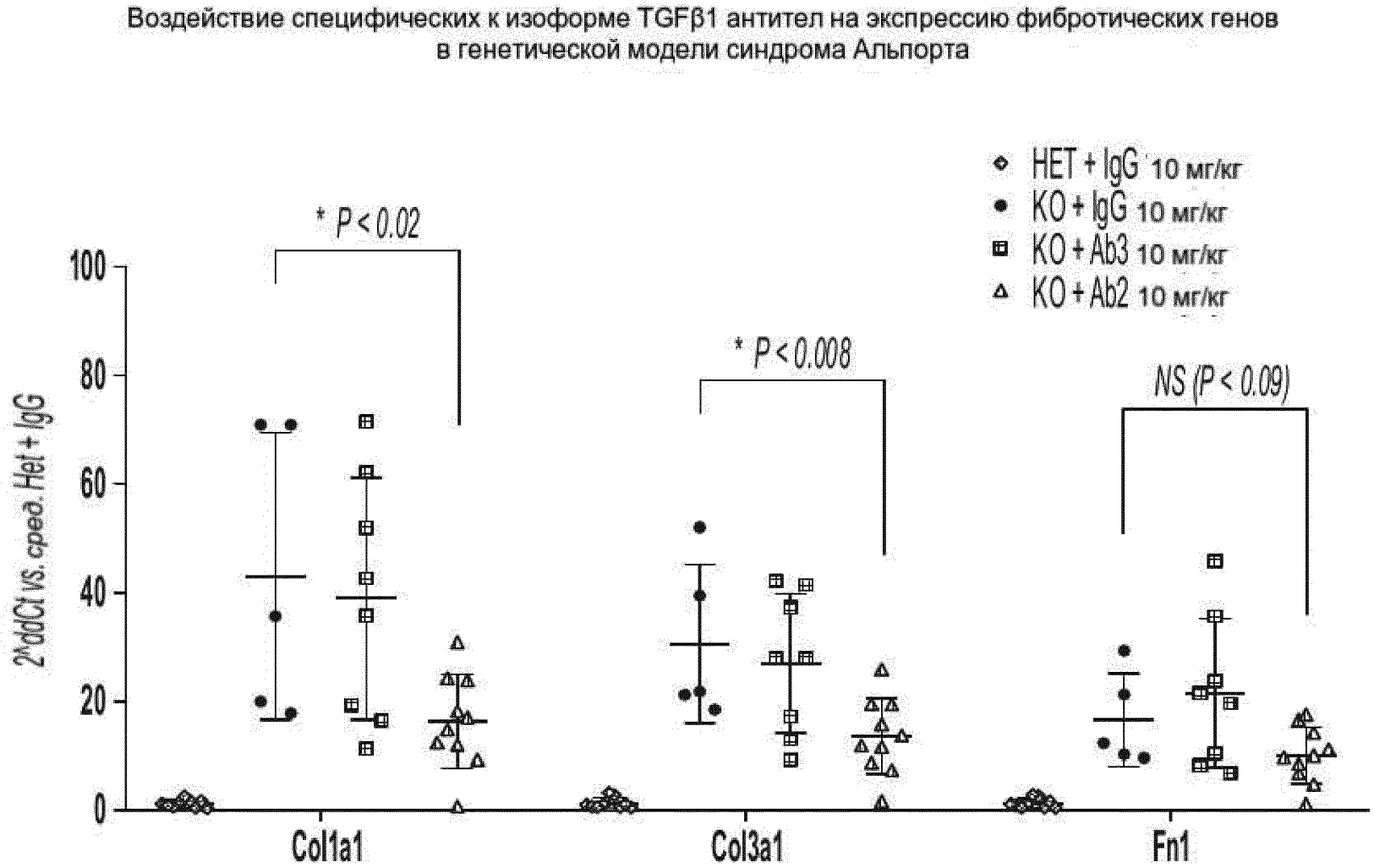
Фиг. 6


Однократная доза (10 мг/кг, 48 часов после введения) Ab2 ингибирует pSMAD2/3
в почках 9-недельных мышей Col4a3 KO
P<0.005
RLU, среднее±CO
0.15
0.10
0.05
0.00
IgG
IgG
Ab2
HET
Col4a3 KO

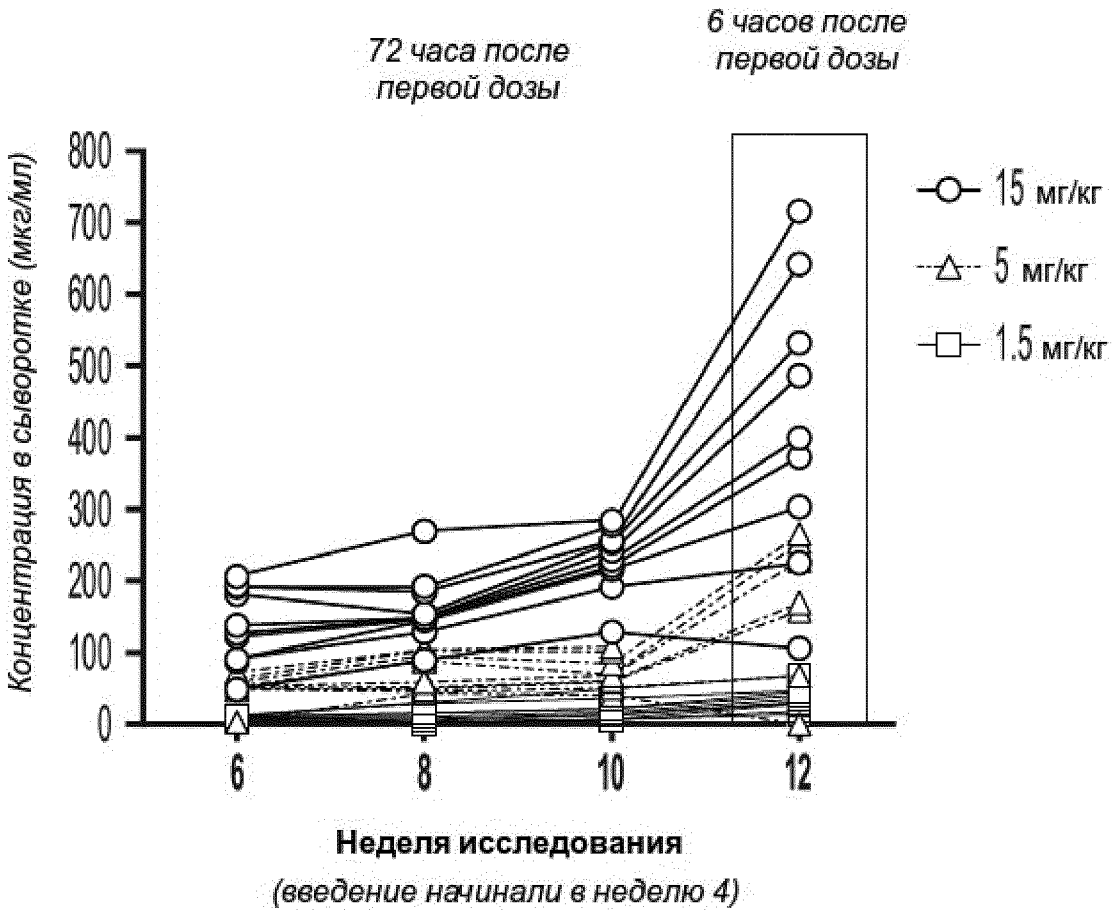
Фиг. 7A


Воздействие специфических к изоформе TGFβ1 антител на pSMAD2/3
в генетической модели синдрома Альпорта
Отношение сигналов pSMAD/общих SMAD
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
***
***
**
***
мг/кг:
10
10
10
3
3
IgG
Ab3
Ab2
Het
KO
* P < 0.05 vs. KO + IgG
** P < 0.005
*** P < 0.0005

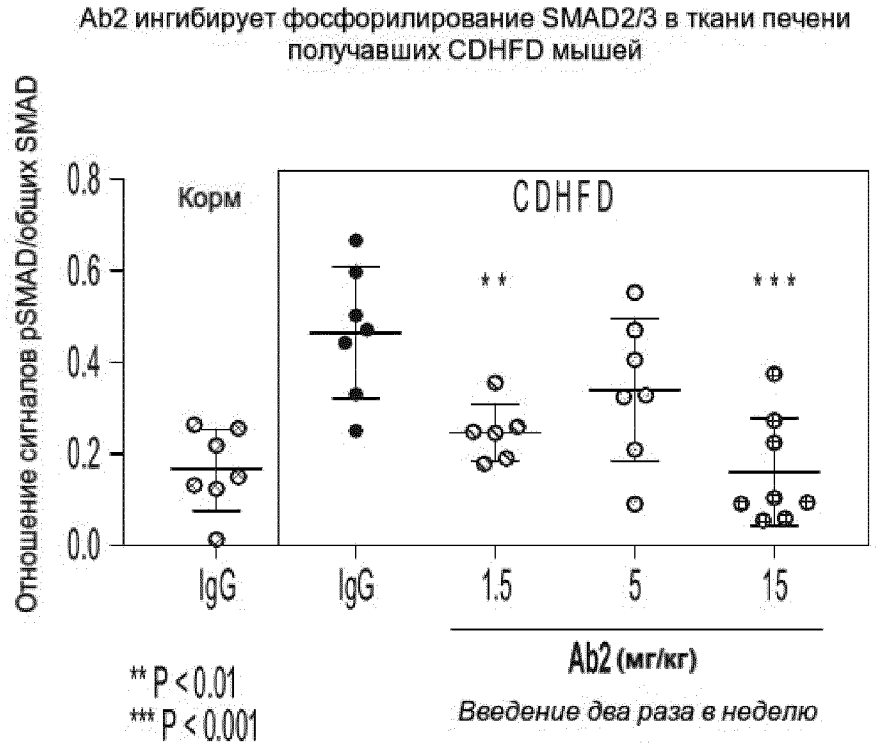
Фиг. 7B


Воздействие специфических к изоформе TGFβ1 антител на экспрессию фибротических генов
в генетической модели синдрома Альпорта
HET + IgG 10 мг/кг
KO + IgG 10 мг/кг
KO + Ab3 10 мг/кг
KO + Ab2 10 мг/кг
* P < 0.02
* P < 0.008
NS (P < 0.09)
2^-ddCt vs. сред. Het + IgG
100
80
60
40
20
0
Col1a1
Col3a1
Fn1

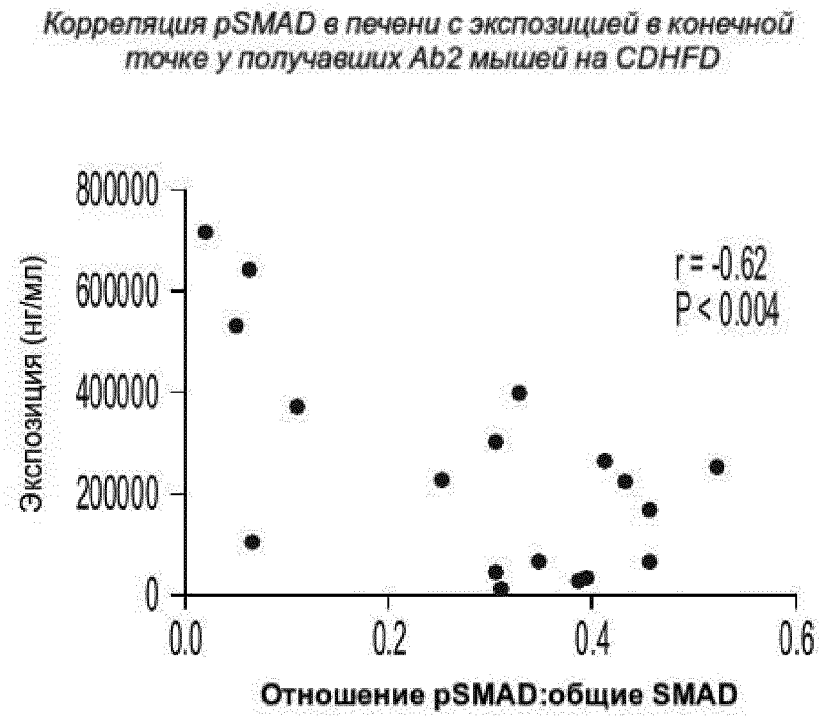
Фиг. 7C


Содержание Ab2 в сыворотке в модели NASH на мышах на CDHFD
72 часа после первой дозы
6 часов после первой дозы
Концентрация в сыворотке (мкг/мл)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
6
8
10
12
Неделя исследования
(введение начинали в неделю 4)
15 мг/кг
5 мг/кг
1.5 мг/кг

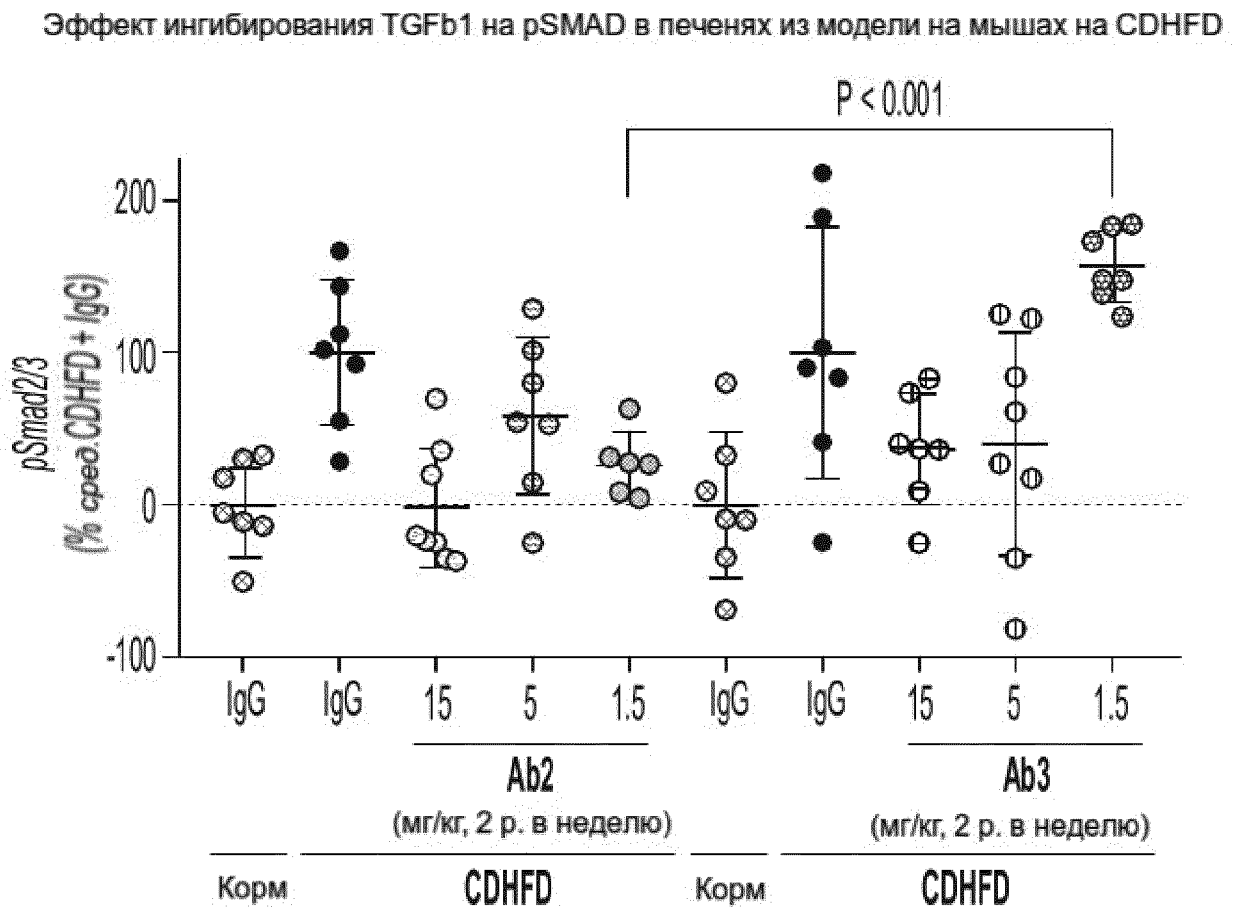
Фиг. 8A


Ab2 ингибирует фосфорилирование SMAD2/3 в ткани печени получавших CDHFD мышей
Отношение сигналов pSMAD/общих SMAD
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Корм
CDHFD
**
***
IgG
IgG
1.5
5
15
Ab2 (мг/кг)
** P < 0.01
*** P < 0.001
Введение два раза в неделю

Фиг. 8B


Корреляция pSMAD в печени с экспозицией в конечной точке у получавших Ab2 мышей на CDHFD
Экспозиция (нг/мл)
800000
600000
400000
200000
0
r = -0.62
P < 0.004
0.0
0.2
0.4
0.6
Отношение pSMAD:общие SMAD

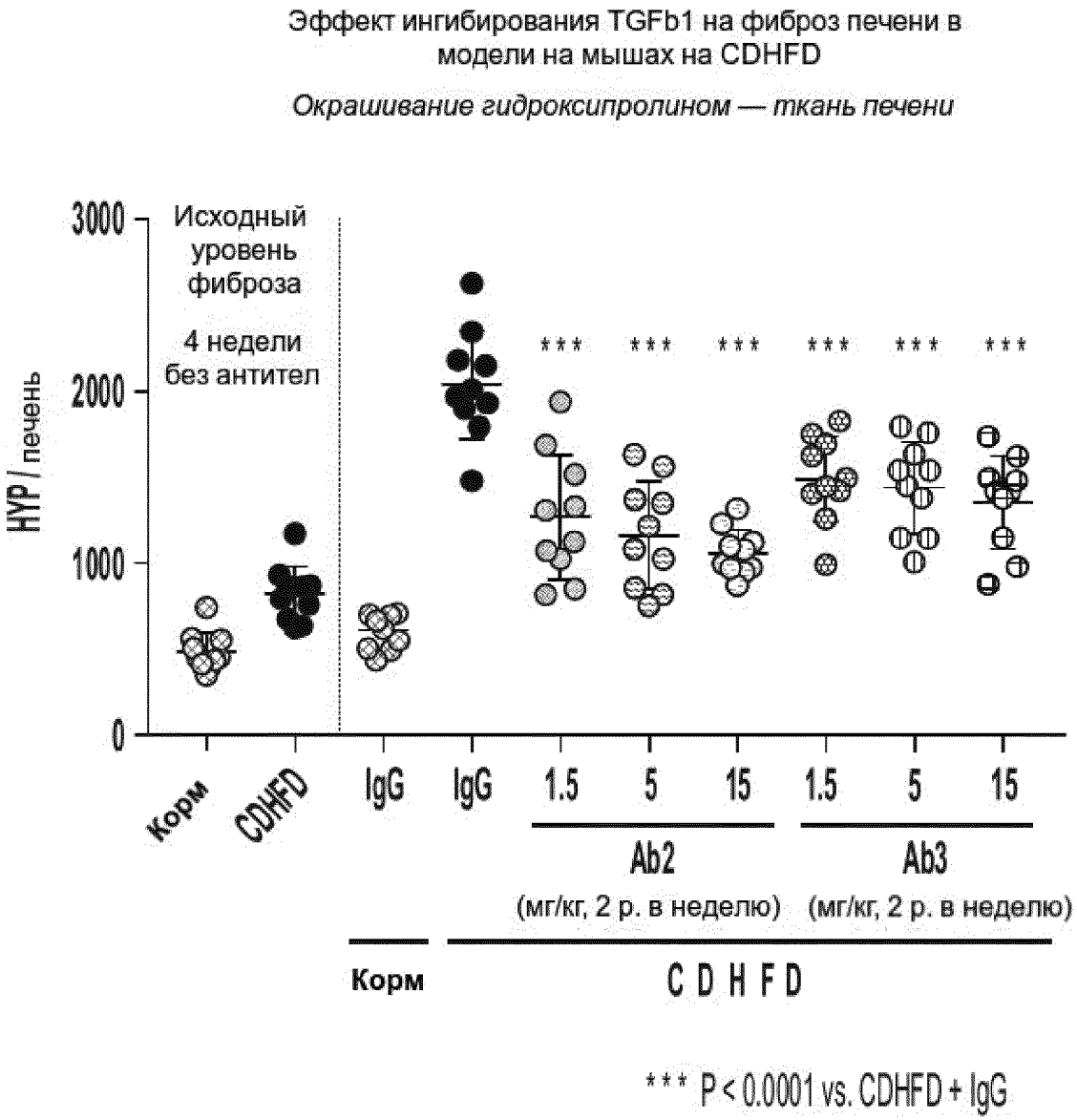
Фиг. 8C



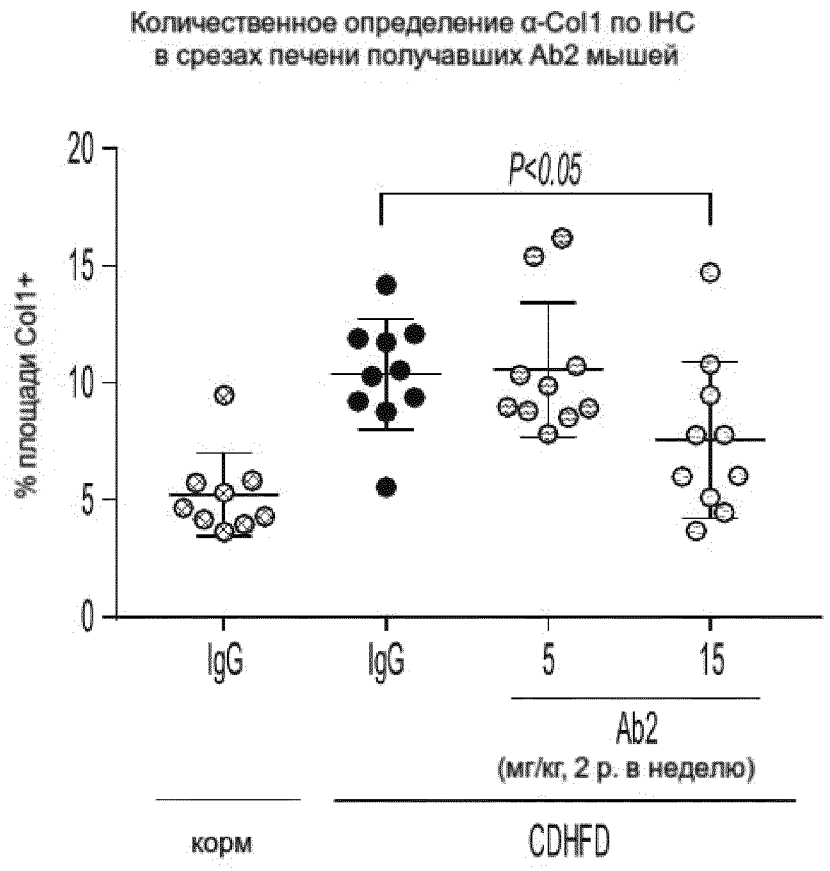
Для непосредственного сравнения данных от образцов с Ab2 и Ab3 данные нормализовали с помощью следующего уравнения:

$$\frac{\text{образец} - AVE_{chow+IgG}}{AVE_{CDHFD+IgG} - AVE_{chow+IgG}} * 100$$

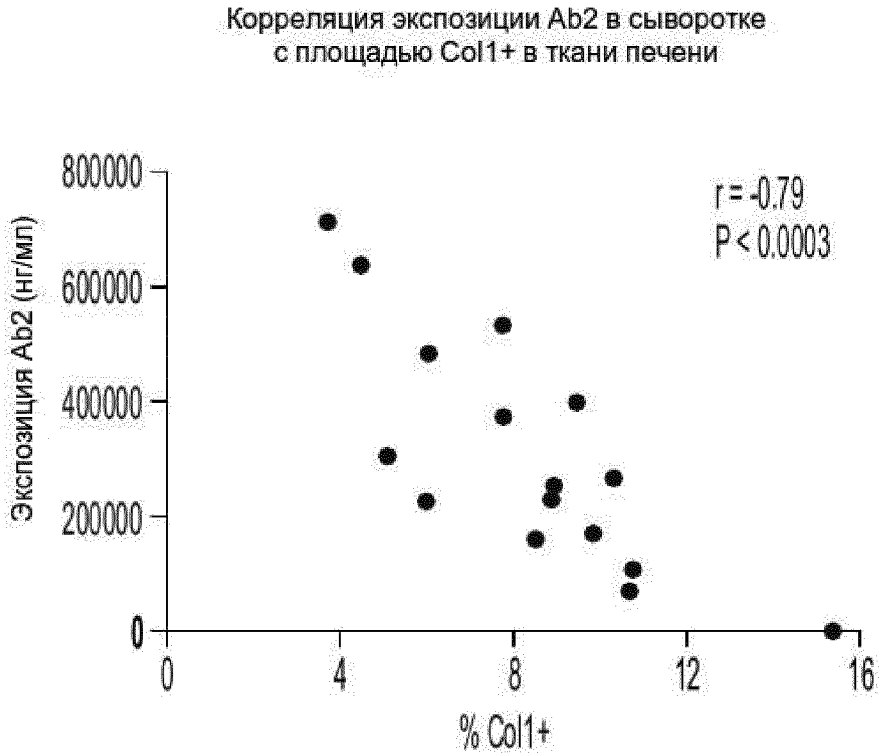
Фиг. 8D


Эффект ингибирования TGFb1 на фиброз печени в модели на мышах на CDHFD
Окрашивание гидроксипролином — ткань печени
HYP / печень
3000
2000
1000
0
Исходный уровень фиброза
4 недели без антител
***
Корм
CDHFD
IgG
IgG
1.5
5
15
1.5
5
15
Ab2
(мг/кг, 2 р. в неделю)
Ab3
(мг/кг, 2 р. в неделю)
Корм
C D H F D
*** P < 0.0001 vs. CDHFD + IgG

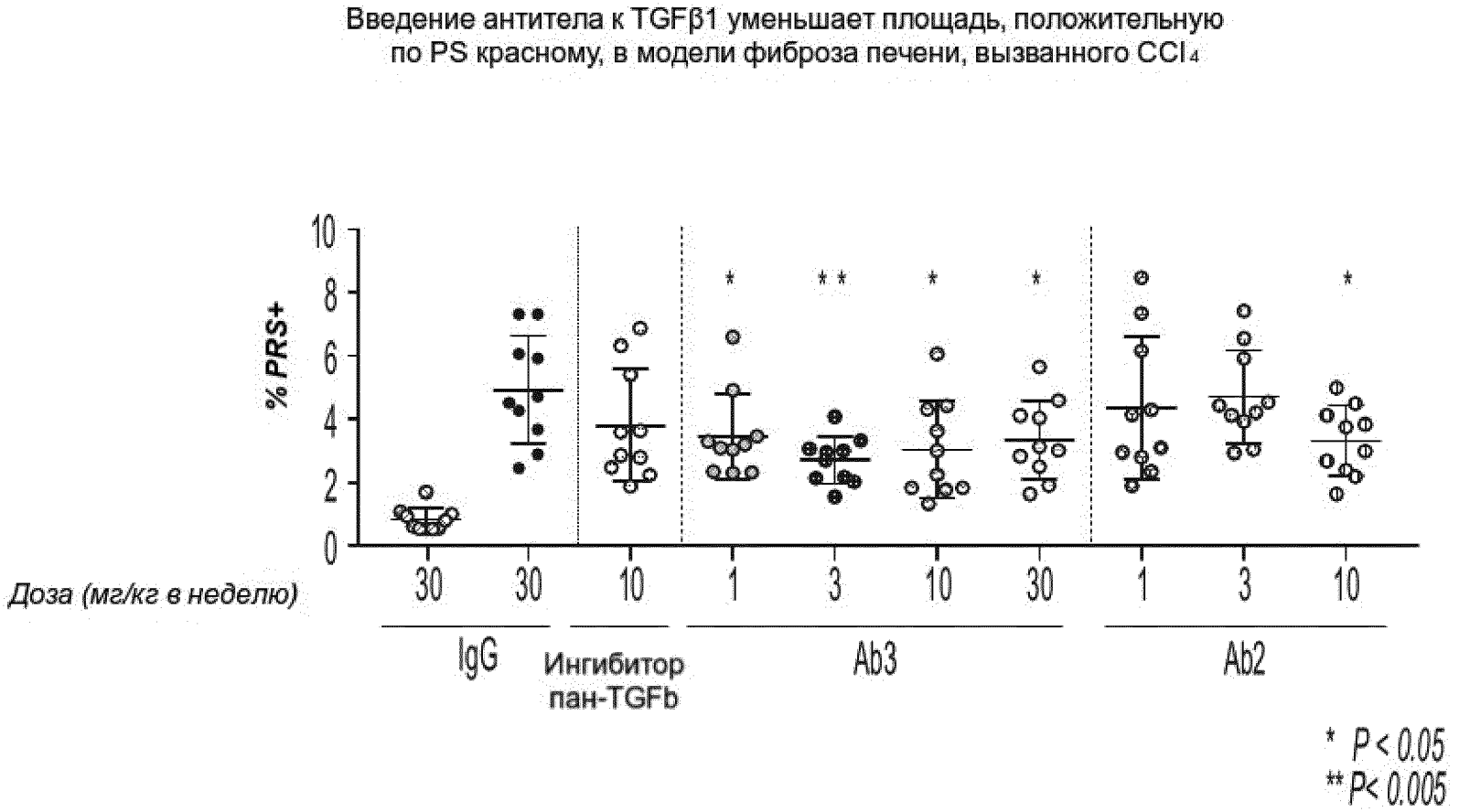
Фиг. 8E


Количественное определение α-Col1 по IHC
в срезах печени получавших Ab2 мышей
% площади Col1+
20
15
10
5
0
P<0.05
IgG
IgG
5
15
Ab2
(мг/кг, 2 р. в неделю)
корм
CDHFD

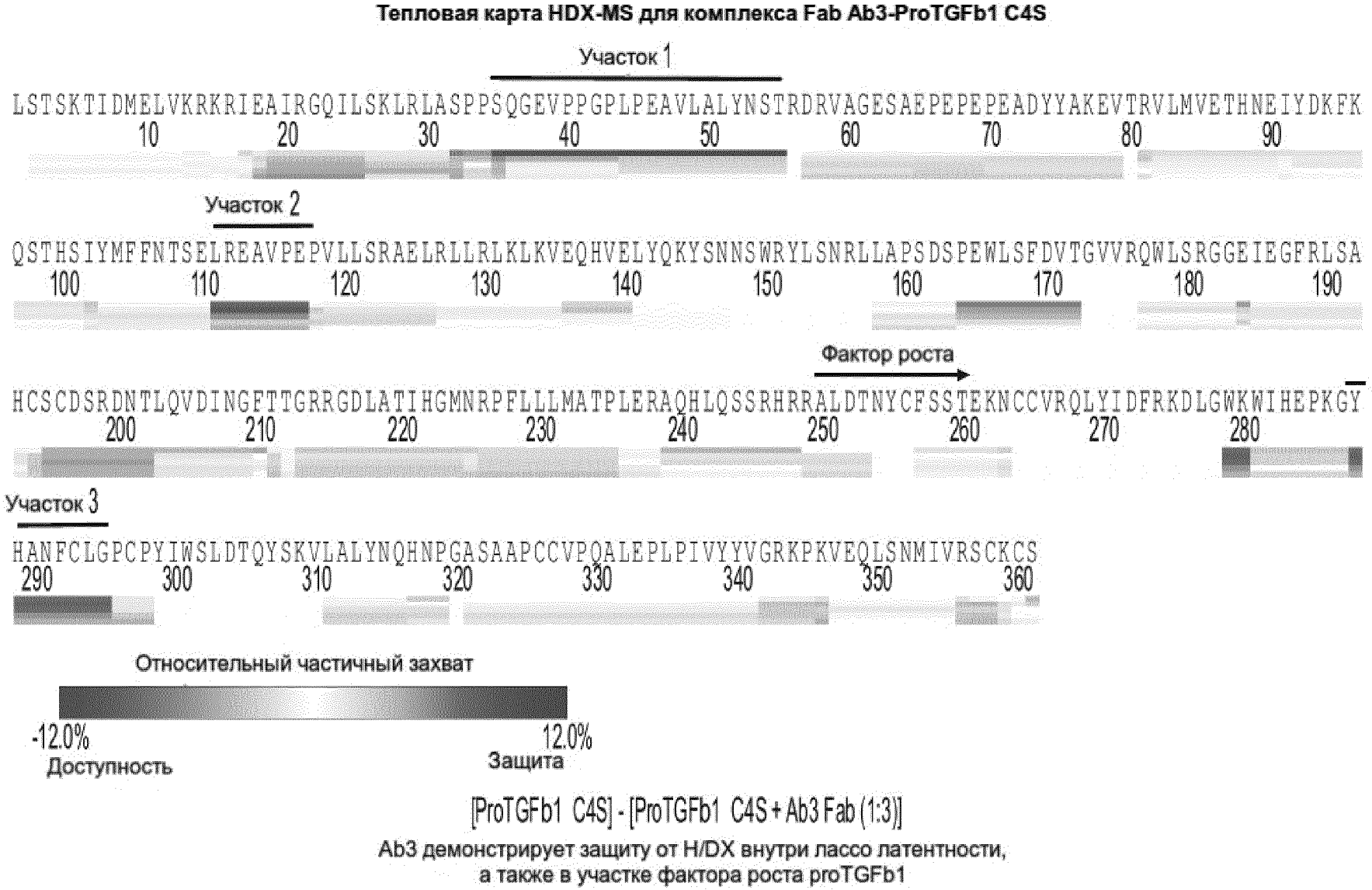
Фиг. 8F


Корреляция экспозиции Ab2 в сыворотке
с площадью Col1+ в ткани печени
Экспозиция Ab2 (нг/мл)
800000
600000
400000
200000
0
r = -0.79
P < 0.0003
0
4
8
12
16
% Col1+

Фиг. 8G

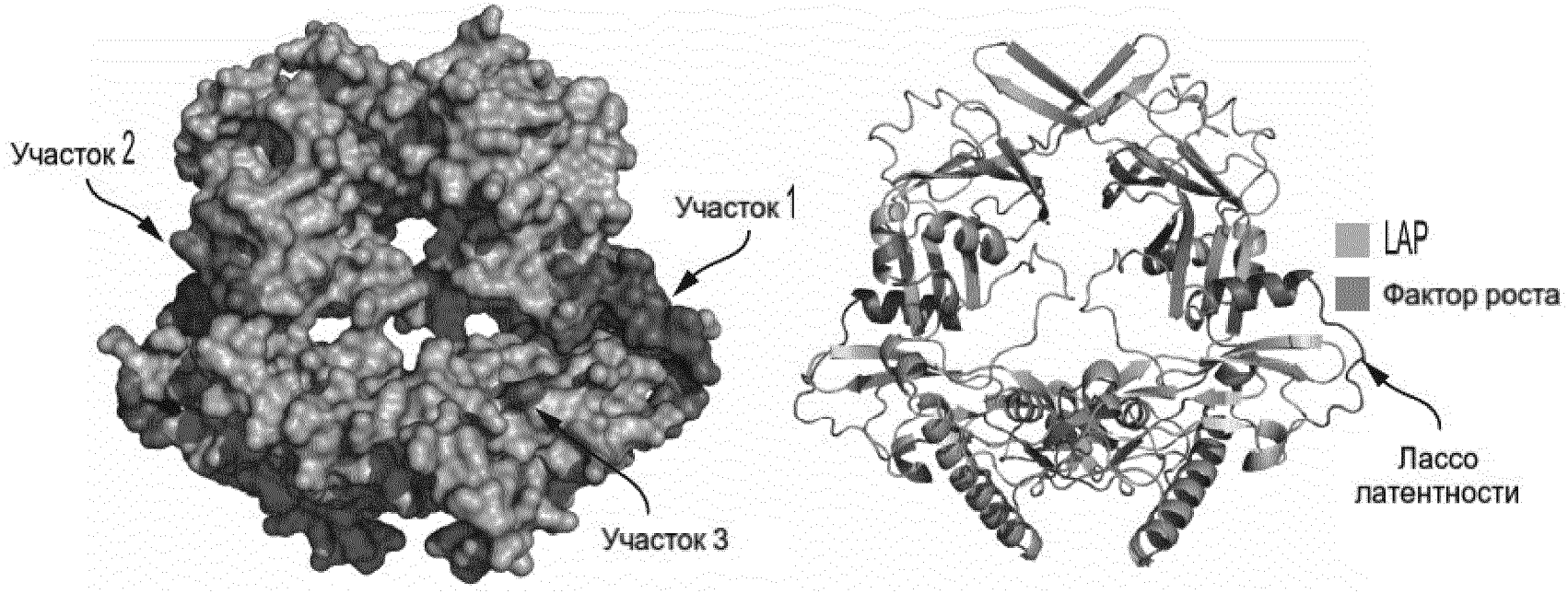

Введение антитела к TGFβ1 уменьшает площадь, положительную по PS красному, в модели фиброза печени, вызванного CCl_4
% PRS+
10
8
6
4
2
0
Доза (мг/кг в неделю)
30
30
10
1
3
10
30
1
3
10
IgG
Ингибитор пан-TGFb
Ab3
Ab2
* P < 0.05
** P< 0.005

Фиг. 9


Тепловая карта HDX-MS для комплекса Fab Ab3-ProTGFb1 C4S
Участок 1
LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFK
10 20 30 40 50 60 70 80 90
Участок 2
QSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSA
100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
Фактор роста
HCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGY
200 210 220 230 240 250 260 270 280
Участок 3
HANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS
290 300 310 320 330 340 350 360
Относительный частичный захват
-12.0%
Доступность
12.0%
Защита
[ProTGFb1 C4S] - [ProTGFb1 C4S + Ab3 Fab (1:3)]
Ab3 демонстрирует защиту от H/DX внутри лассо латентности,
а также в участке фактора роста proTGFb1

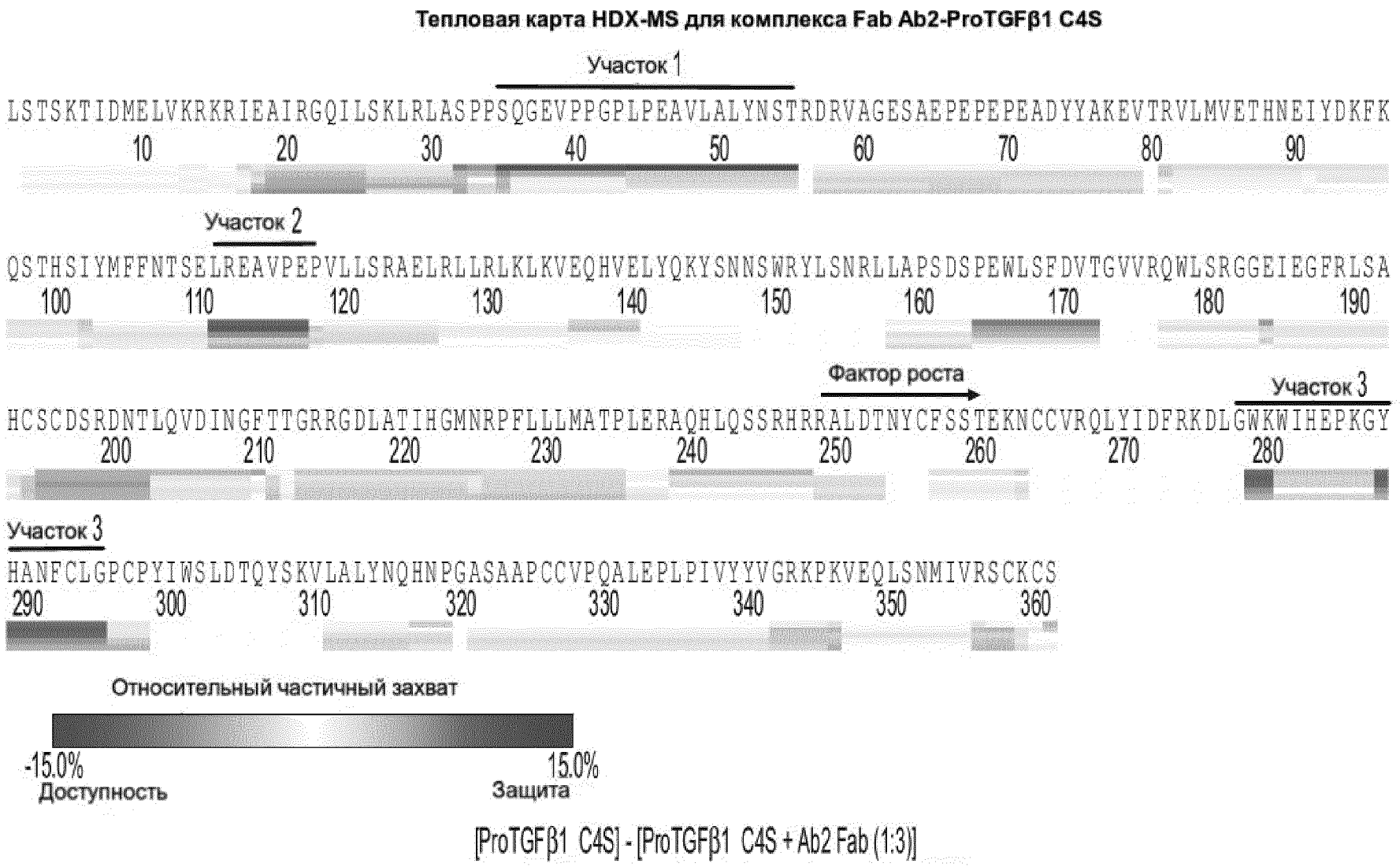
Фиг. 10A

Защищенные Ab3 участки демонстрируют значительное разнообразие последовательностей в лассо латентности



	Участок 1	Участок 2	Участок 3
TGFB1_HUMAN	...SQGEVPPGPLPEAVLALYNST...	...LREAVPE...	...YHANFCLG...
TGFB2_HUMAN	...EDY-PEPEEVPPEVISIYNST...	...ME---KN...	...YNANFCAG...
TGFB3_HUMAN	...EPT-V-MTHVPYQVLALYNST...	...VE---KN...	...YYANFCSG...

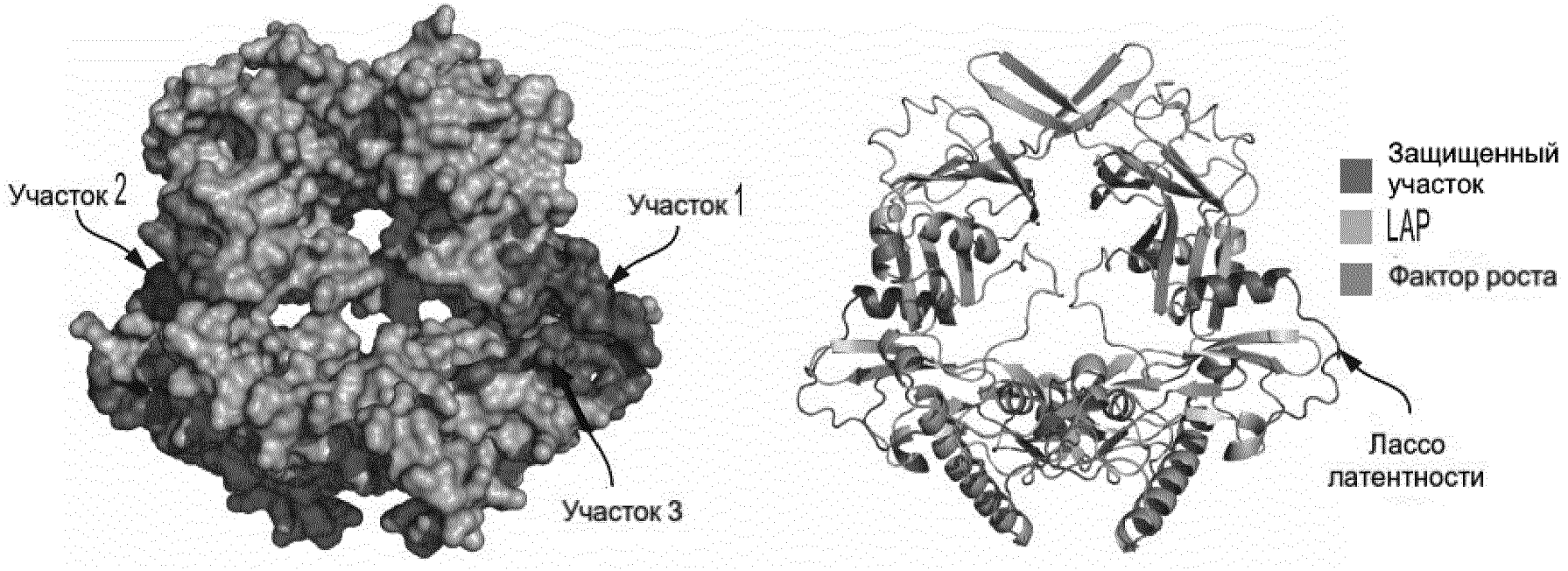
Фиг. 10B



Ab2 демонстрирует защиту от H/DX внутри лассо латентности proTGFb1

Фиг. 10C

Защищенные Ab2 участки демонстрируют значительное разнообразие последовательностей

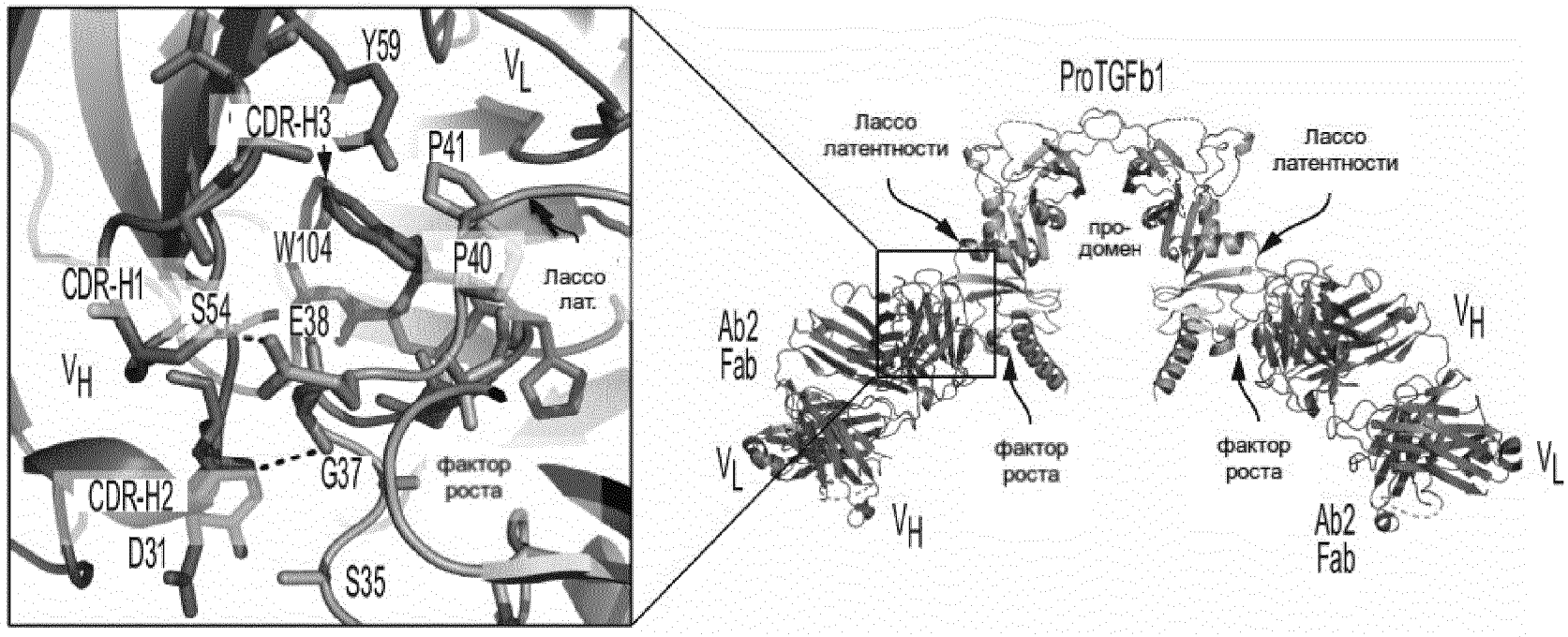


	Участок 1	Участок 2	Участок 3
TGFB1_HUMAN	...SPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNST...	...LREAVPE...	...WKWIHEPKGYHANFCLG...
TGFB2_HUMAN	...SPPEDY-PEPEEVPPEVISIYNST...	...ME---KN...	...WKWIHEPKGYNANFCAG...
TGFB3_HUMAN	...SPPEPT-V-MTHVPYQVLALYNST...	...VE---KN...	...WKWvHEPKGYYANFCSG...

Фиг. 10D

Кристаллическая структура комплекса Ab2-Fab/proTGFb

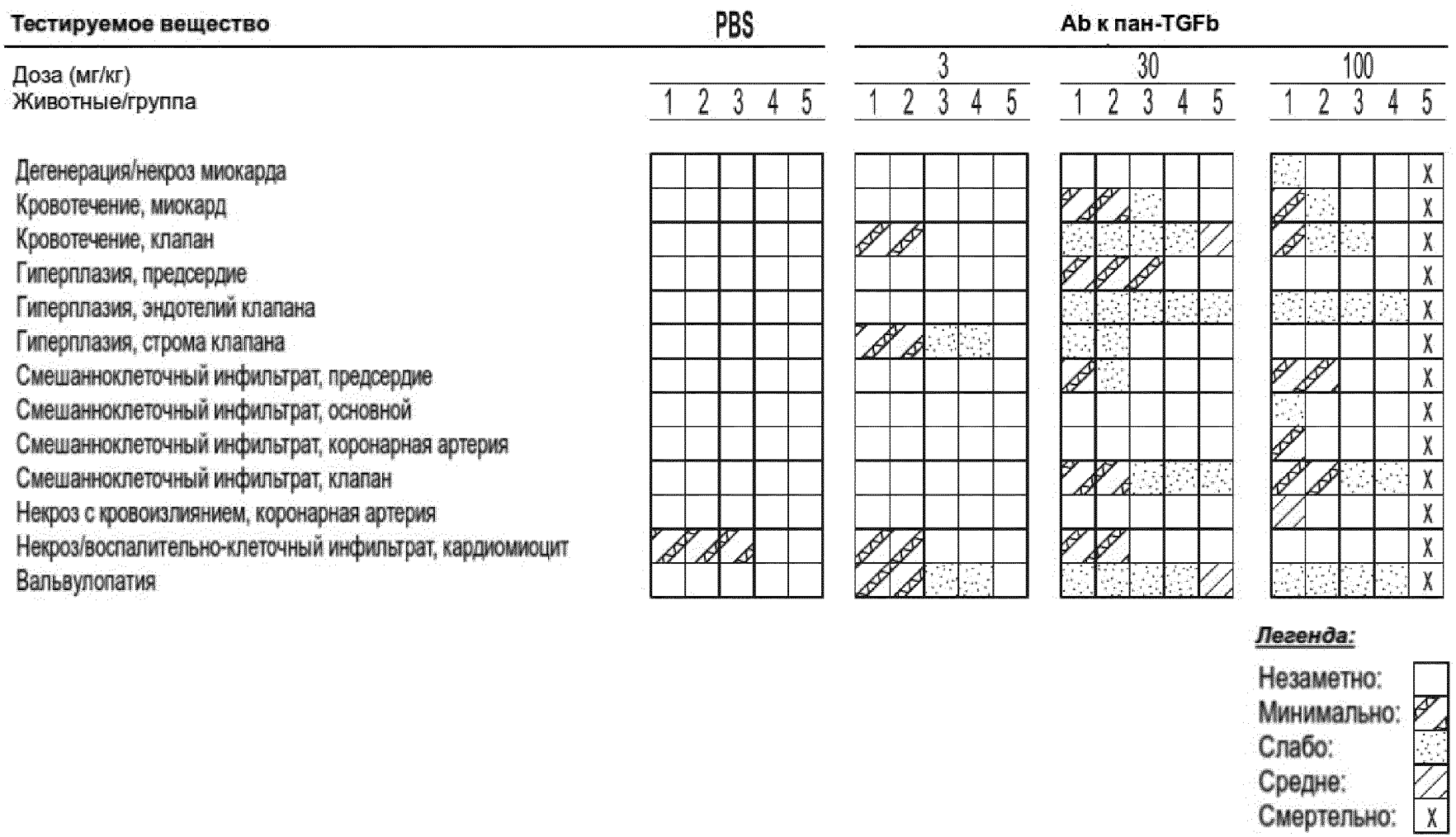
```
proTGFb1_HUMAN      27KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL49
proTGFb2_HUMAN      27KLKLTSPPEDY-PEPEEVPPEVI48
proTGFb3_HUMAN      27KLRLTSPPEPT-V-MTHVPYQVL47
```



Фиг. 11

Данные о антителе к пан-TGFβ из 1-недельного исследования безопасности на крысах Fischer_344

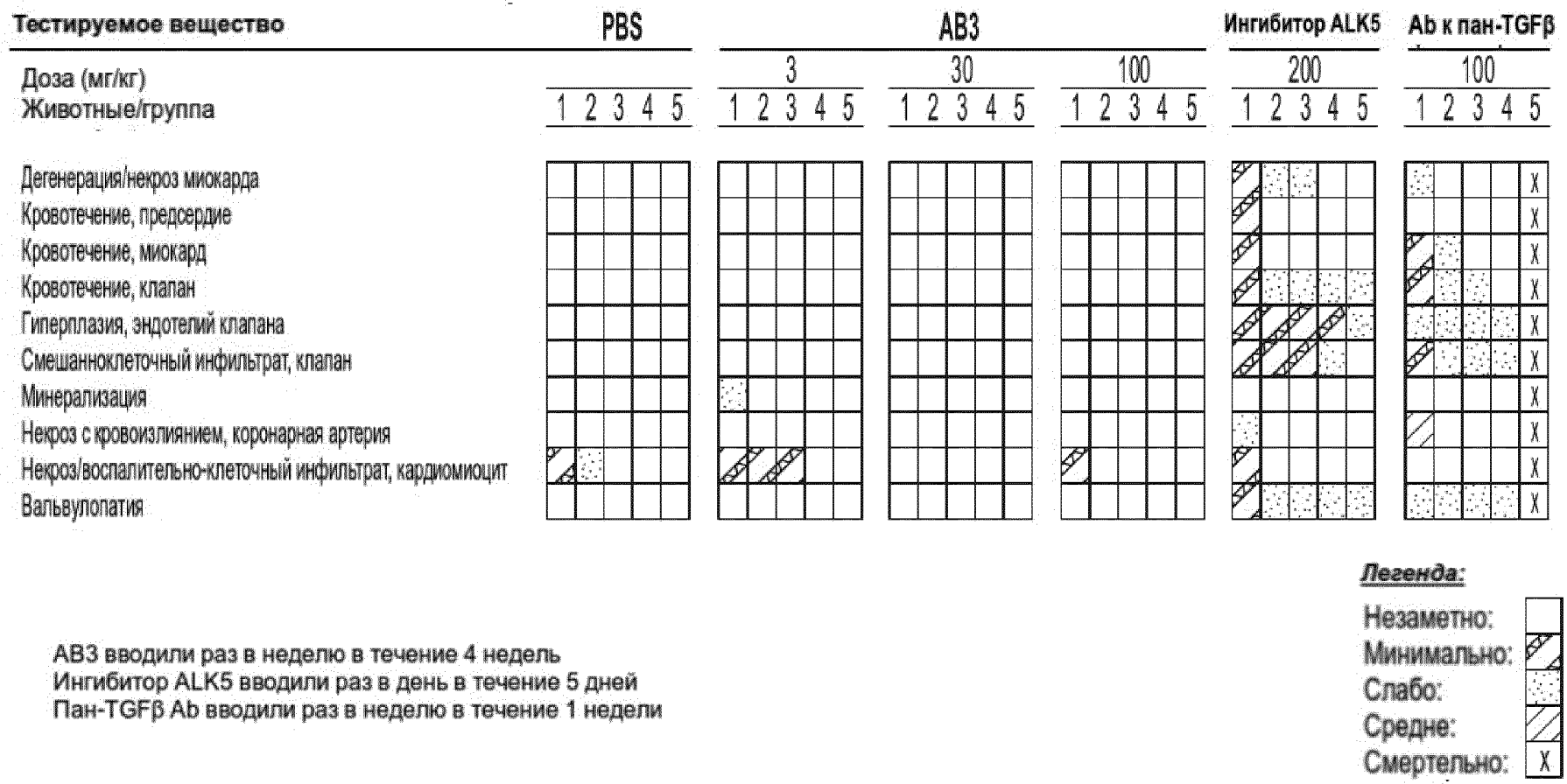
Пример сердца, микроскопическое исследование



Фиг. 12A

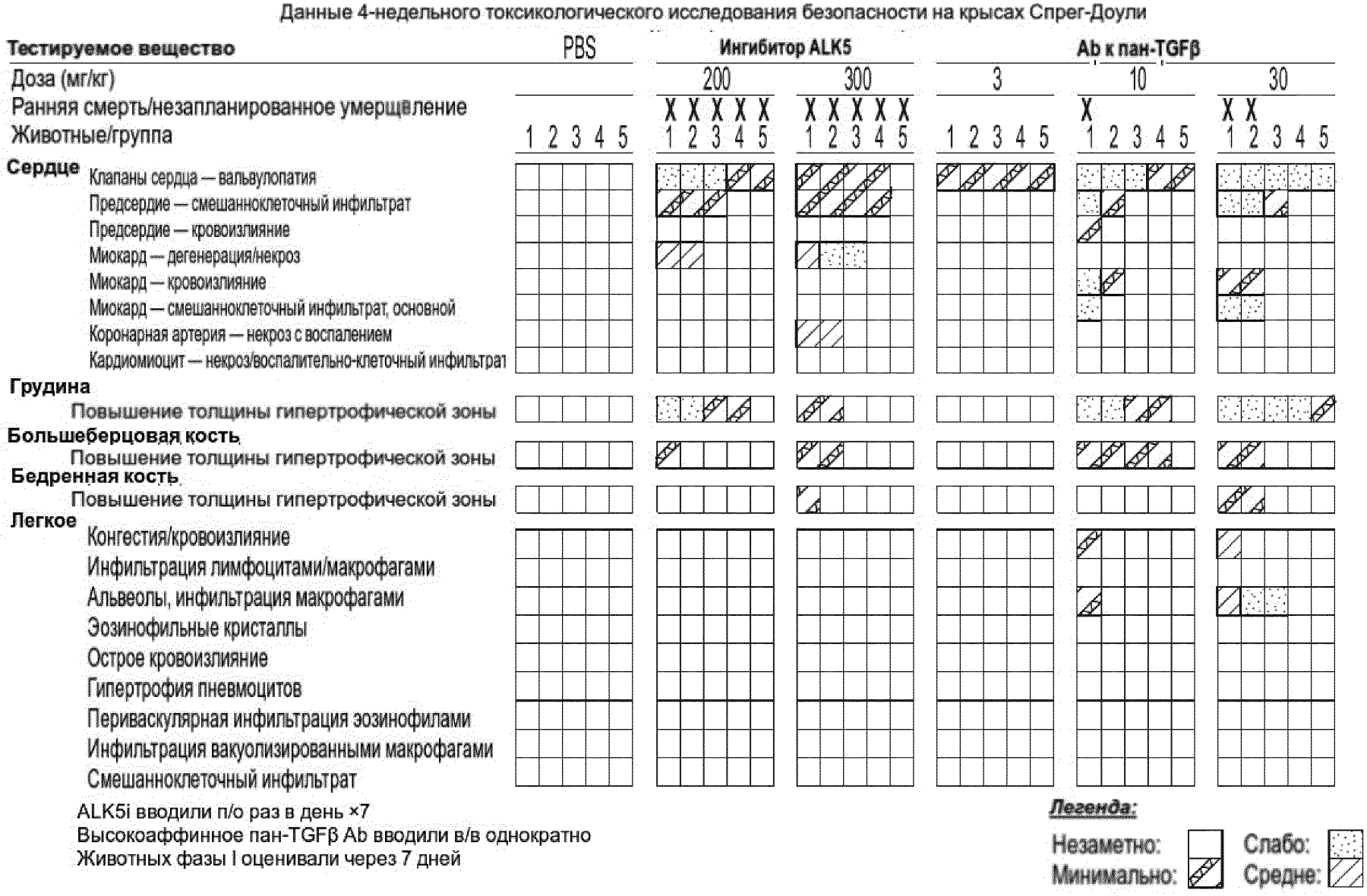
Данные о антителе к TGFβ (Ab3) из 4-недельного токсикологического исследования безопасности на крысах Fischer_344

Патология сердца, микроскопическое исследование



AB3 вводили раз в неделю в течение 4 недель
Ингибитор ALK5 вводили раз в день в течение 5 дней
Пан-TGFβ Ab вводили раз в неделю в течение 1 недели

Фиг. 12B

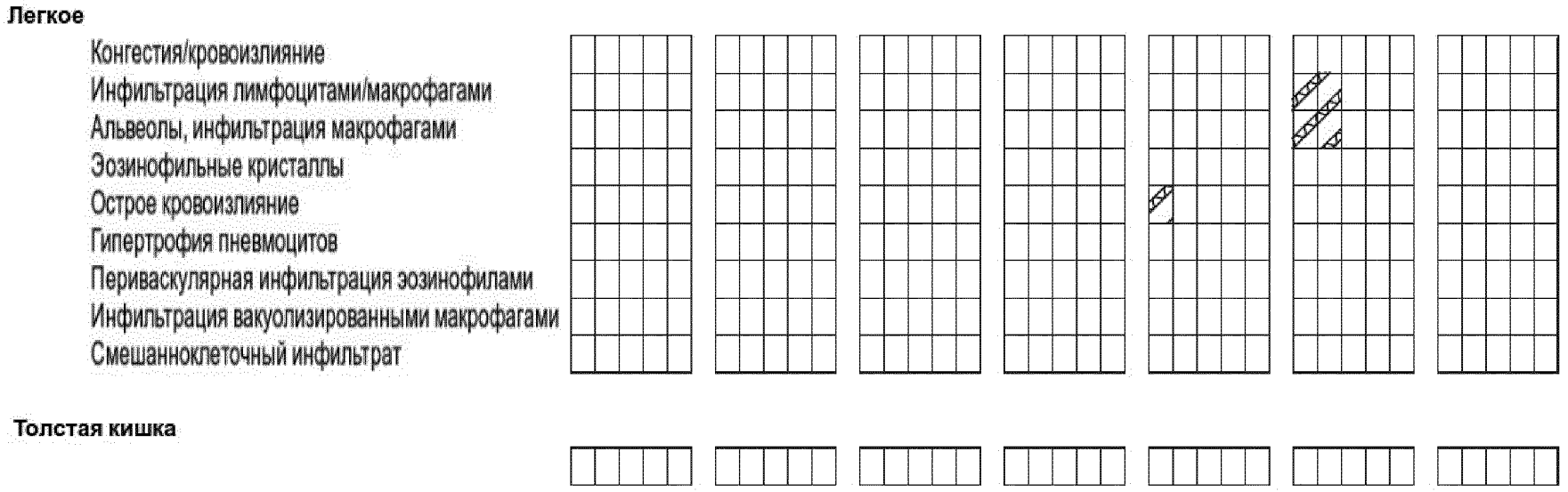

Данные 4-недельного токсикологического исследования безопасности на крысах Спрег-Доули
Тестируемое вещество
PBS
Ингибитор ALK5
Ab к пан-TGFβ
Доза (мг/кг)
200
300
3
10
30
Ранняя смерть/незапланированное умерщвление
Животные/группа
1 2 3 4 5
Сердце
Клапаны сердца — вальвулопатия
Предсердие — смешанноклеточный инфильтрат
Предсердие — кровоизлияние
Миокард — дегенерация/некроз
Миокард — кровоизлияние
Миокард — смешанноклеточный инфильтрат, основной
Коронарная артерия — некроз с воспалением
Кардиомиоцит — некроз/воспалительно-клеточный инфильтрат
Грудина
Повышение толщины гипертрофической зоны
Большеберцовая кость
Повышение толщины гипертрофической зоны
Бедренная кость
Повышение толщины гипертрофической зоны
Легкое
Конгестия/кровоизлияние
Инфильтрация лимфоцитами/макрофагами
Альвеолы, инфильтрация макрофагами
Эозинофильные кристаллы
Острое кровоизлияние
Гипертрофия пневмоцитов
Периваскулярная инфильтрация эозинофилами
Инфильтрация вакуолизированными макрофагами
Смешанноклеточный инфильтрат
ALK5i вводили п/о раз в день ×7
Высокоаффинное пан-TGFβ Ab вводили в/в однократно
Животных фазы I оценивали через 7 дней
Легенда:
Незаметно:
Слабо:
Минимально:
Средне:

Фиг. 12C

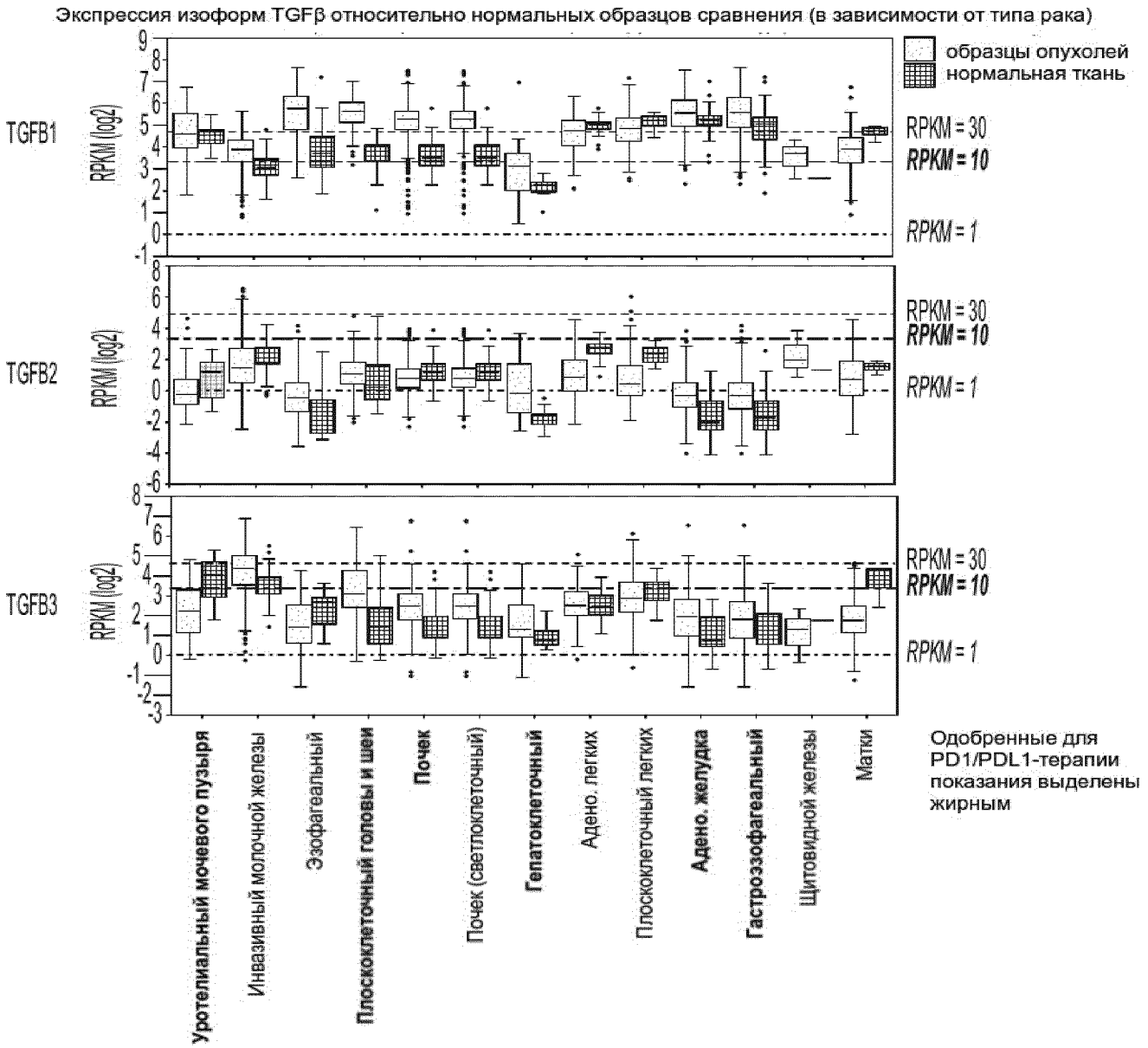
Данные 4-недельного токсикологического исследования безопасности на крысах Спрег-Доули

Тестируемое вещество	PBS	Ab3			Ab2		
Доза (мг/кг)		10	30	100	10	30	100
Ранняя смерть/незапланированное умерщвление						X	
Животные/группа	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
Сердце							
Клапаны сердца — вальвулопатия							
Предсердие — смешанноклеточный инфильтрат							
Предсердие — кровоизлияние							
Миокард — дегенерация/некроз							
Миокард — кровоизлияние							
Миокард — смешанноклеточный инфильтрат, основной							
Коронарная артерия — некроз с воспалением							
Кардиомиоцит — некроз/воспалительно-клеточный инфильтрат							
Грудина							
Повышение толщины гипертрофической зоны							
Большеберцовая кость							
Повышение толщины гипертрофической зоны							
Бедренная кость							
Повышение толщины гипертрофической зоны							

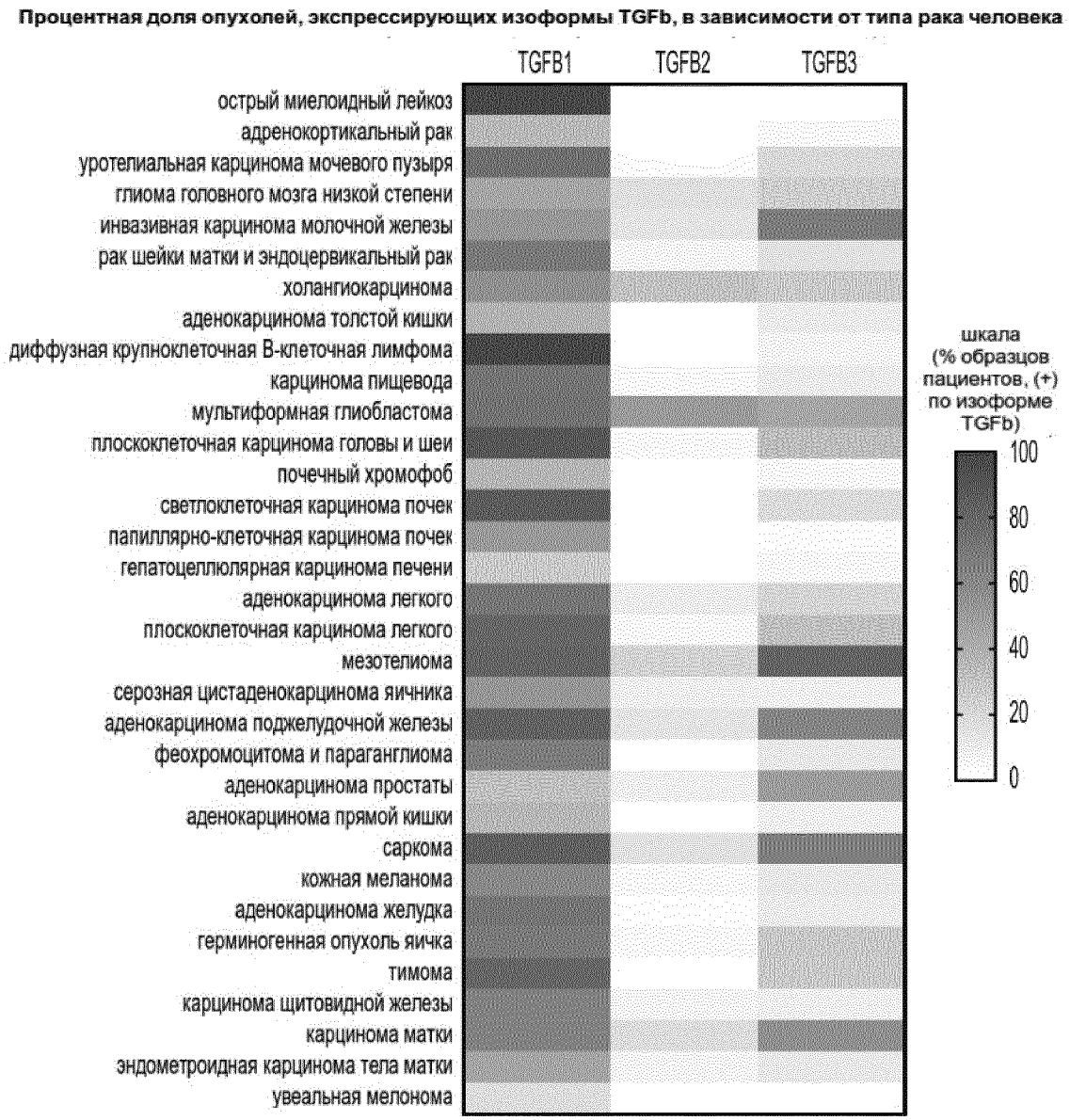
Фиг. 12D-1


Легкое
Конгестия/кровоизлияние
Инфильтрация лимфоцитами/макрофагами
Альвеолы, инфильтрация макрофагами
Эозинофильные кристаллы
Острое кровоизлияние
Гипертрофия пневмоцитов
Периваскулярная инфильтрация эозинофилами
Инфильтрация вакуолизированными макрофагами
Смешанноклеточный инфильтрат
Толстая кишка
Антитела вводили раз в неделю ×4 в/в
Животных фазы II оценивали
через 28 дней
«Одно животное, которому вводили дозу 30 мг/кг [Ab2] обнаружили мертвым непосредственно после введения в день 8 фазы II. Эта смерть была связана с процедурой введения и не связана с тестируемым веществом. Больше во время фазы II смертей не было.»
Легенда:
Незаметно:
Минимально:
Слабо:
Средне:

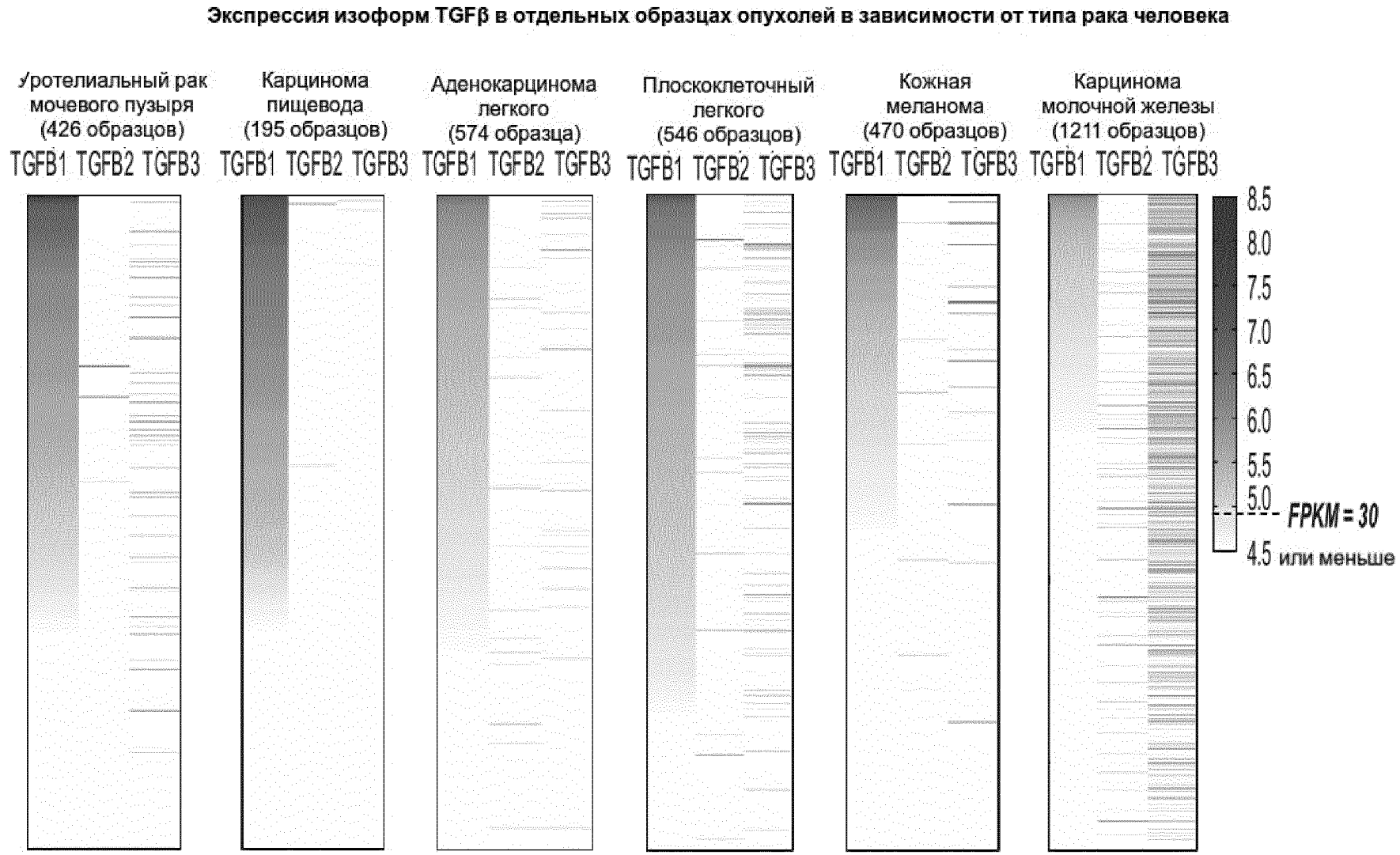
Фиг. 12D-2


Экспрессия изоформ TGFβ относительно нормальных образцов сравнения (в зависимости от типа рака)
образцы опухолей
нормальная ткань
TGFB1
TGFB2
TGFB3
RPKM (log2)
RPKM = 30
RPKM = 10
RPKM = 1
Уротелиальный мочевого пузыря
Инвазивный молочной железы
Эзофагеальный
Плоскоклеточный головы и шеи
Почек
Почек (светлоклеточный)
Гепатоклеточный
Адено. легких
Плоскоклеточный легких
Адено. желудка
Гастроэзофагеальный
Щитовидной железы
Матки
Одобренные для PD1/PDL1-терапии показания выделены жирным

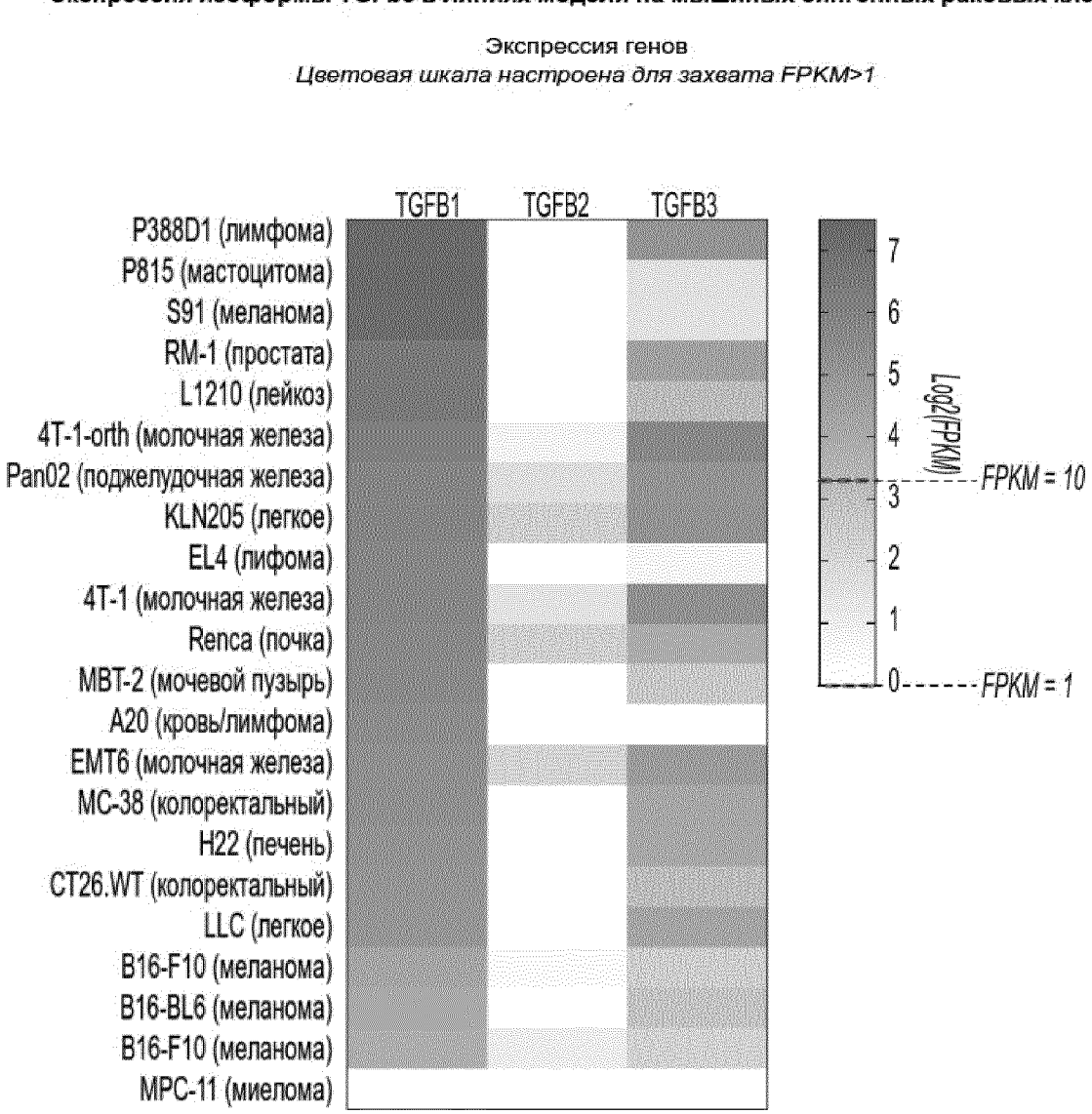
Фиг. 13A


Процентная доля опухолей, экспрессирующих изоформы TGFb, в зависимости от типа рака человека
TGFB1
TGFB2
TGFB3
острый миелоидный лейкоз
адренокортикальный рак
уротелиальная карцинома мочевого пузыря
глиома головного мозга низкой степени
инвазивная карцинома молочной железы
рак шейки матки и эндоцервикальный рак
холангиокарцинома
аденокарцинома толстой кишки
диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома
карцинома пищевода
мультиформная глиобластома
плоскоклеточная карцинома головы и шеи
почечный хромофоб
светлоклеточная карцинома почек
папиллярно-клеточная карцинома почек
гепатоцеллюлярная карцинома печени
аденокарцинома легкого
плоскоклеточная карцинома легкого
мезотелиома
серозная цистаденокарцинома яичника
аденокарцинома поджелудочной железы
феохромоцитома и параганглиома
аденокарцинома простаты
аденокарцинома прямой кишки
саркома
кожная меланома
аденокарцинома желудка
герминогенная опухоль яичка
тимома
карцинома щитовидной железы
карцинома матки
эндометроидная карцинома тела матки
увеальная мелонома
шкала (% образцов пациентов, (+) по изоформе TGFb)
100
80
60
40
20
0

Фиг. 13B

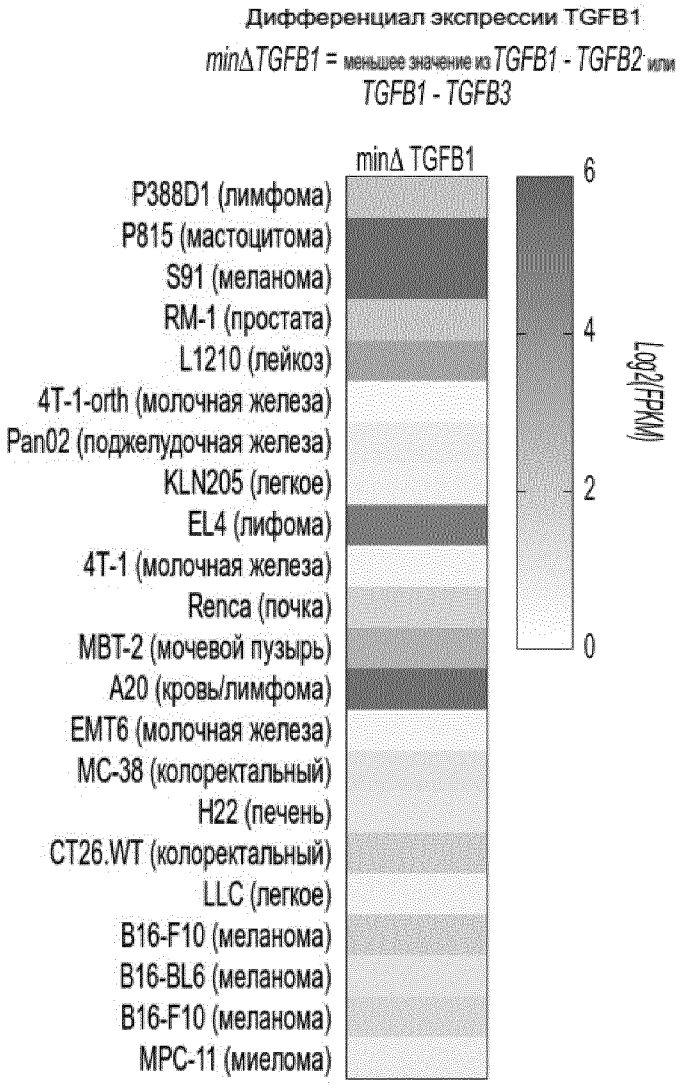

Экспрессия изоформ TGFβ в отдельных образцах опухолей в зависимости от типа рака человека
Уротелиальный рак мочевого пузыря (426 образцов)
Карцинома пищевода (195 образцов)
Аденокарцинома легкого (574 образца)
Плоскоклеточный легкого (546 образцов)
Кожная меланома (470 образцов)
Карцинома молочной железы (1211 образцов)
TGFB1 TGFB2 TGFB3
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
FPKM = 30
4.5 или меньше

Фиг. 13C

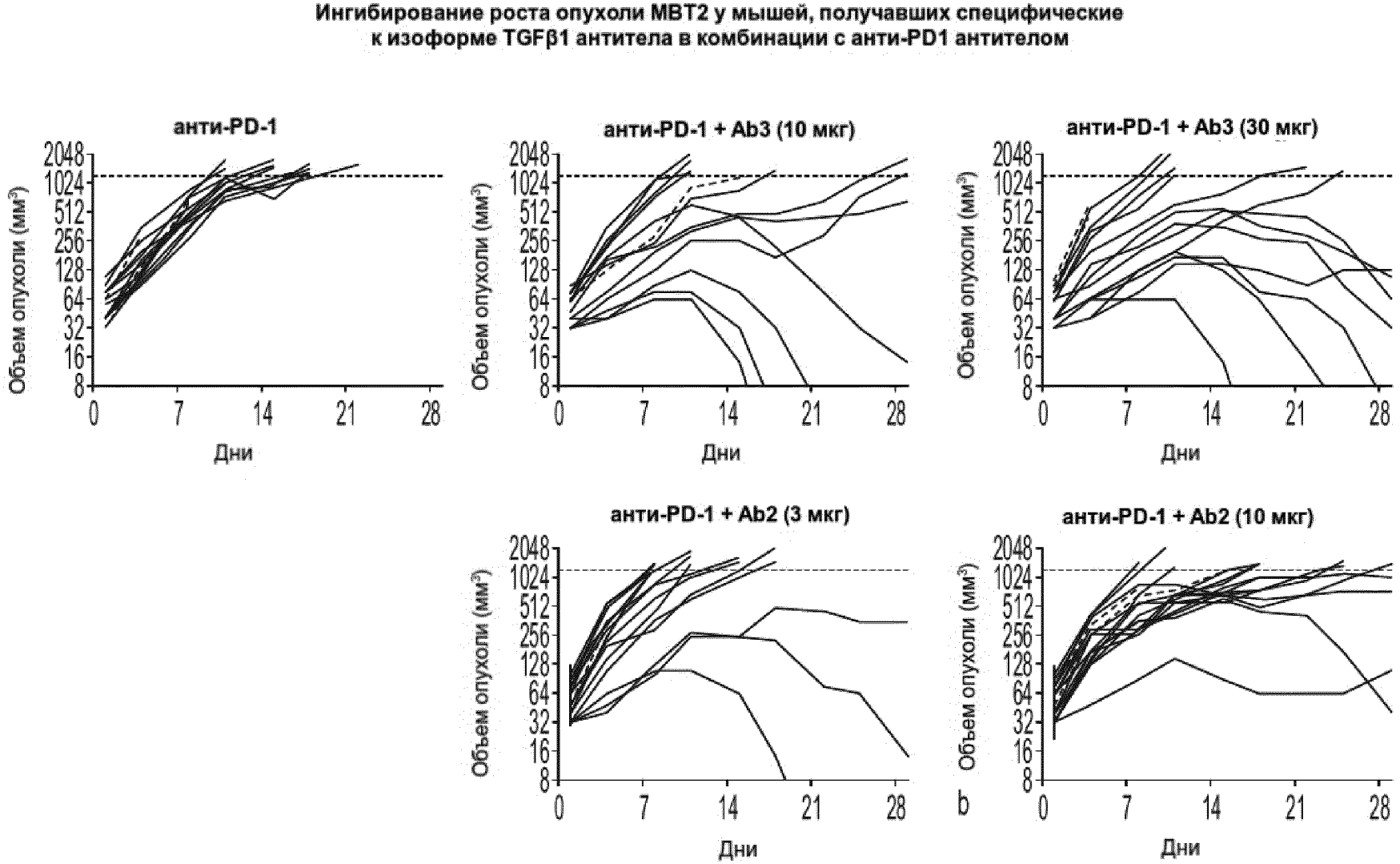

Экспрессия изоформы TGFb3 в линиях модели на мышиных сингенных раковых клетках
Экспрессия генов
Цветовая шкала настроена для захвата FPKM>1
TGFB1
TGFB2
TGFB3
P388D1 (лимфома)
P815 (мастоцитома)
S91 (меланома)
RM-1 (простата)
L1210 (лейкоз)
4T-1-orth (молочная железа)
Pan02 (поджелудочная железа)
KLN205 (легкое)
EL4 (лифома)
4T-1 (молочная железа)
Renca (почка)
MBT-2 (мочевой пузырь)
A20 (кровь/лимфома)
EMT6 (молочная железа)
MC-38 (колоректальный)
H22 (печень)
CT26.WT (колоректальный)
LLC (легкое)
B16-F10 (меланома)
B16-BL6 (меланома)
B16-F10 (меланома)
MPC-11 (миелома)
7
6
5
4
3
2
1
0
Log2(FPKM)
FPKM = 10
FPKM = 1

Фиг. 13D-1

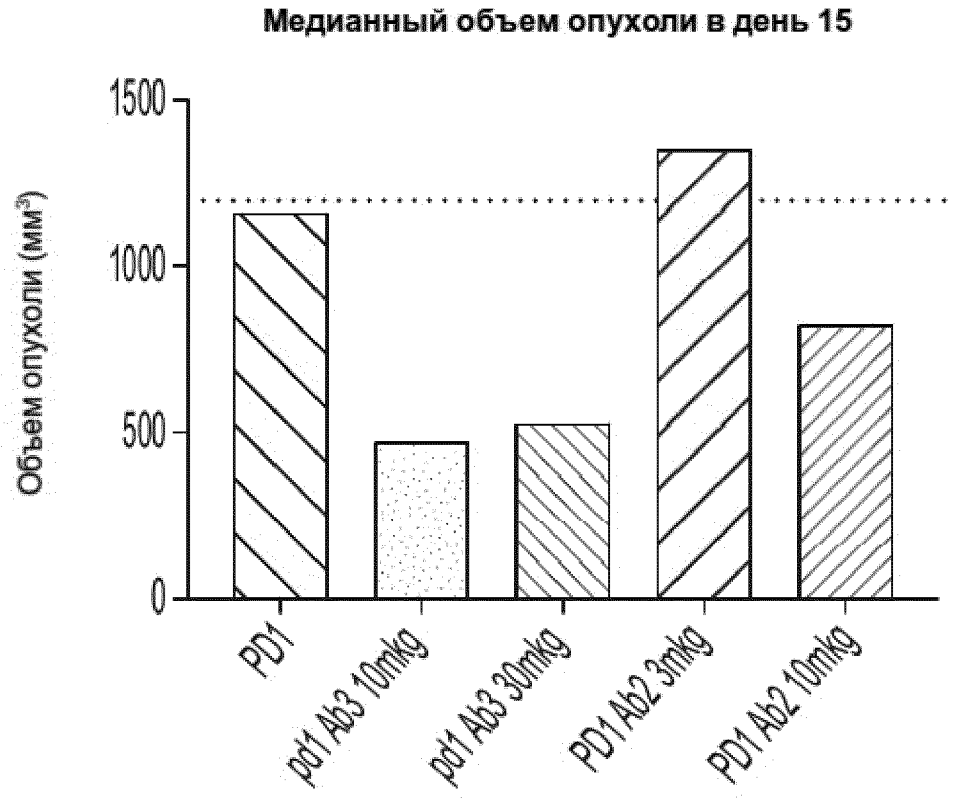
Экспрессия изоформы TGFb3 в линиях модели на мышиных сингенных раковых клетках



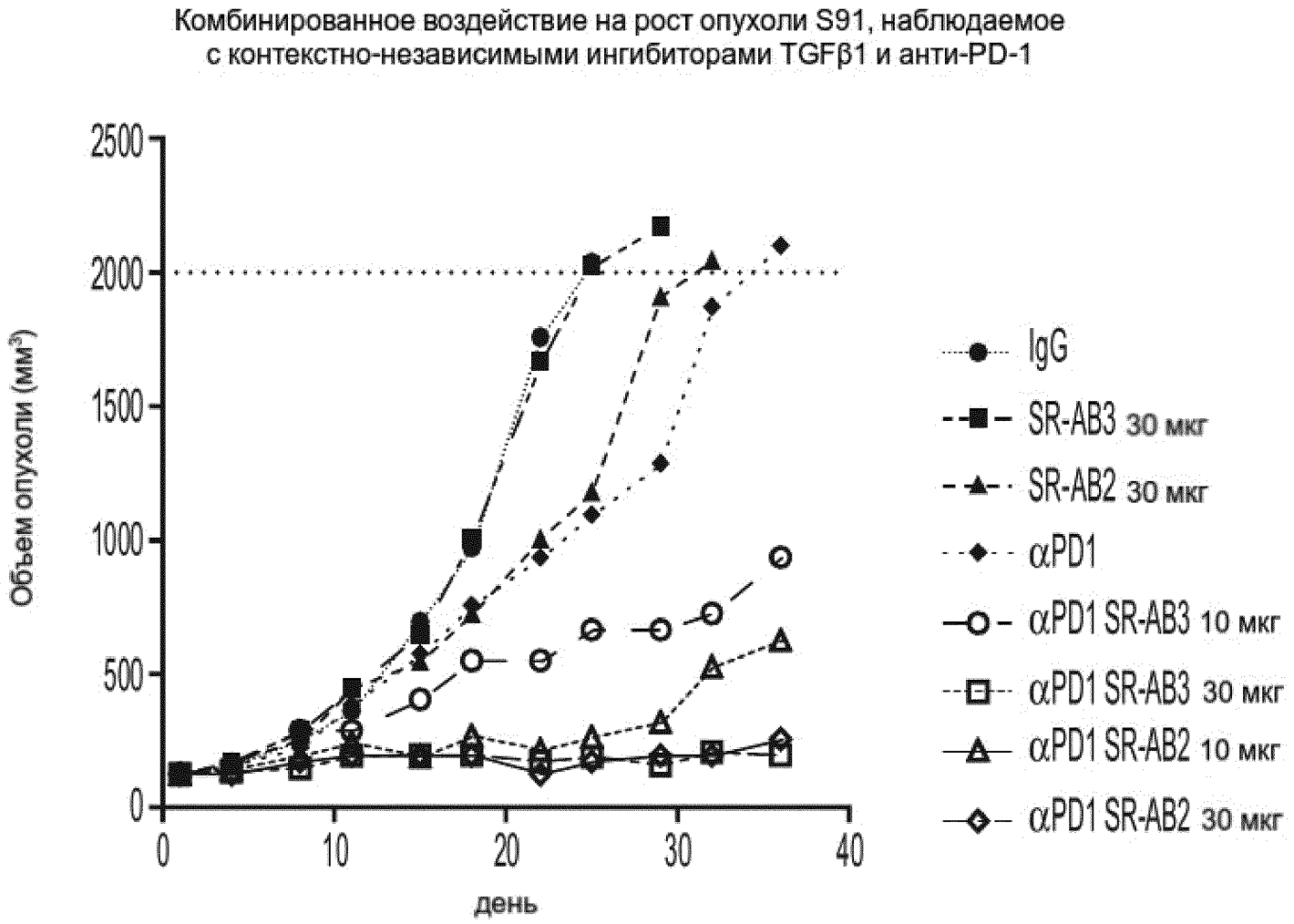
Фиг. 13D-2


Ингибирование роста опухоли MBT2 у мышей, получавших специфические к изоформе TGFβ1 антитела в комбинации с анти-PD1 антителом
анти-PD-1
анти-PD-1 + Ab3 (10 мкг)
анти-PD-1 + Ab3 (30 мкг)
анти-PD-1 + Ab2 (3 мкг)
анти-PD-1 + Ab2 (10 мкг)
Объем опухоли (мм³)
2048
1024
512
256
128
64
32
16
8
0
7
14
21
28
Дни
b

Фиг. 14


Медианный объем опухоли в день 15
Объем опухоли (мм³)
1500
1000
500
0
PD1
pd1 Ab3 10mkg
pd1 Ab3 30mkg
PD1 Ab2 3mkg
PD1 Ab2 10mkg

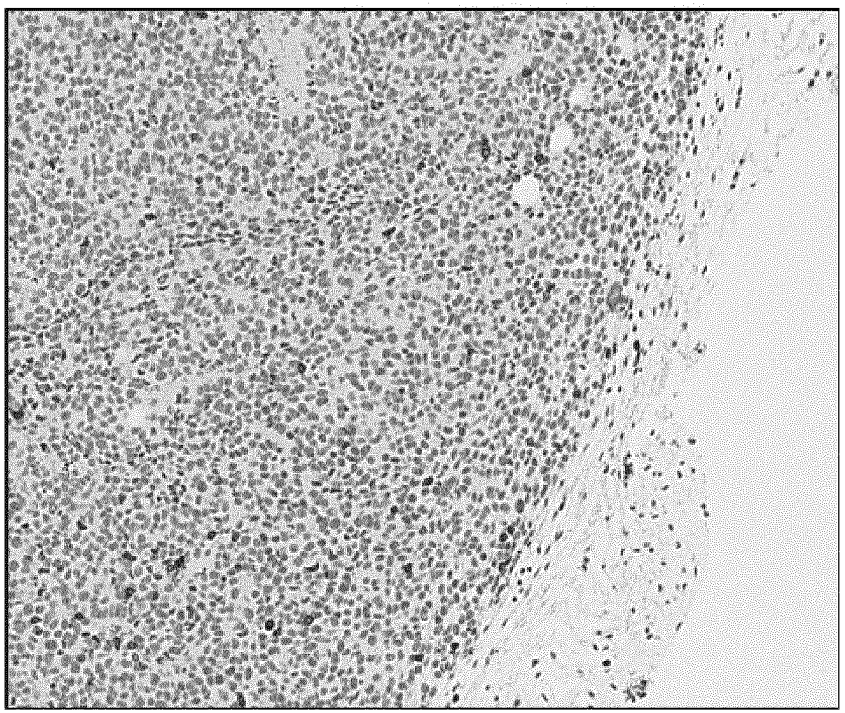
Фиг. 15


Комбинированное воздействие на рост опухоли S91, наблюдаемое
с контекстно-независимыми ингибиторами TGFβ1 и анти-PD-1
Объем опухоли (мм³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
день
IgG
SR-AB3 30 мкг
SR-AB2 30 мкг
αPD1
αPD1 SR-AB3 10 мкг
αPD1 SR-AB3 30 мкг
αPD1 SR-AB2 10 мкг
αPD1 SR-AB2 30 мкг

Фиг. 16

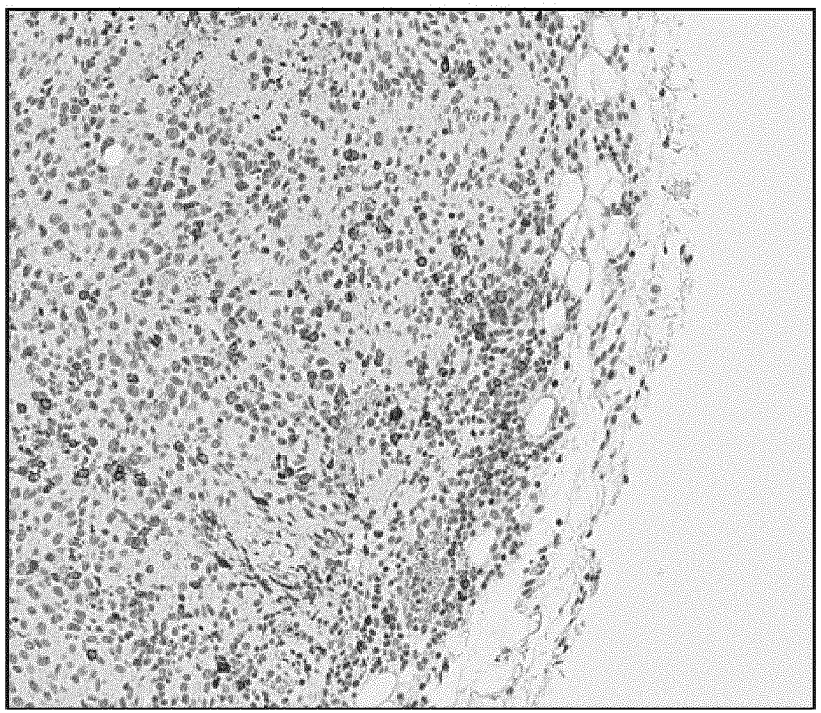
Ингибирование активации TGFβ1 вызывает инфильтрацию CD8+ Т-клеток в опухоль S91

Фиг. 17A



Вводили анти-PD-1;
окрашивали маркером CD8+

Фиг. 17B

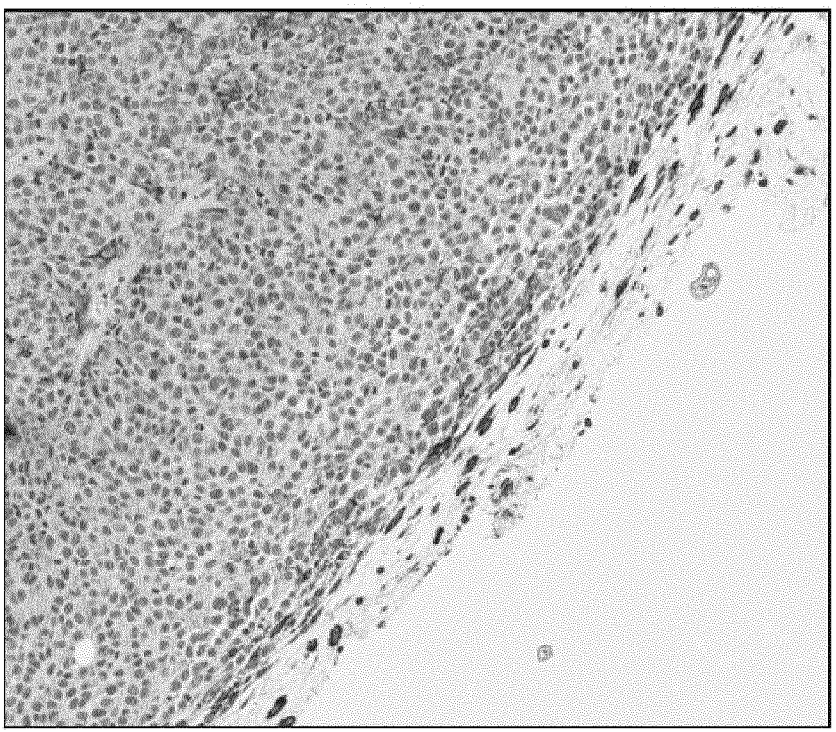


Вводили анти-PD-1 + контекстно-незав. ингибитор TGFβ1;
окрашивали маркером CD8+

Фиг. 17A, 17B

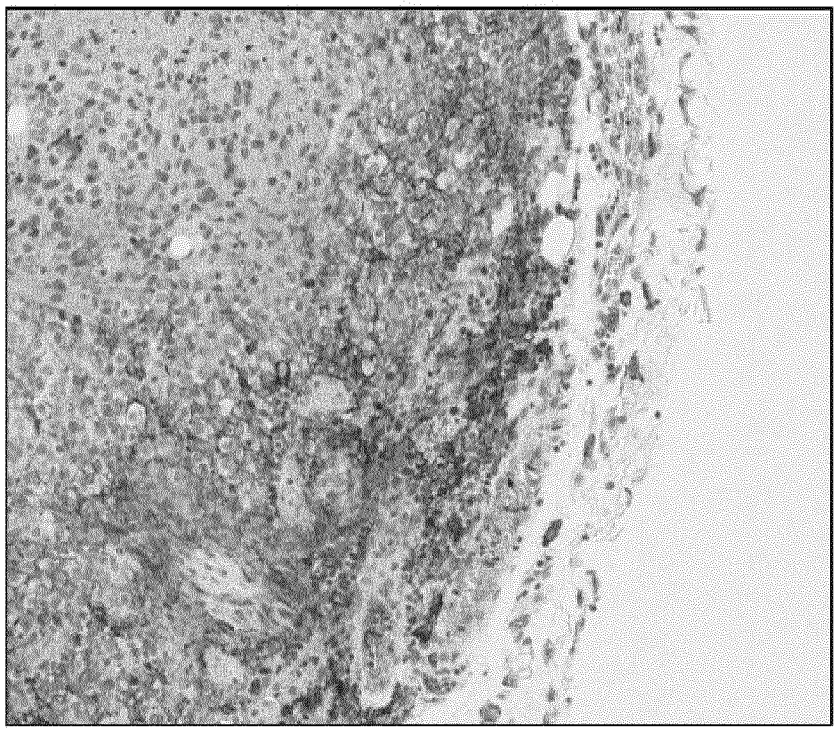
Инфильтрация макрофагов в опухоли S91, наблюдаемая после комбинированного введения

Фиг. 18A



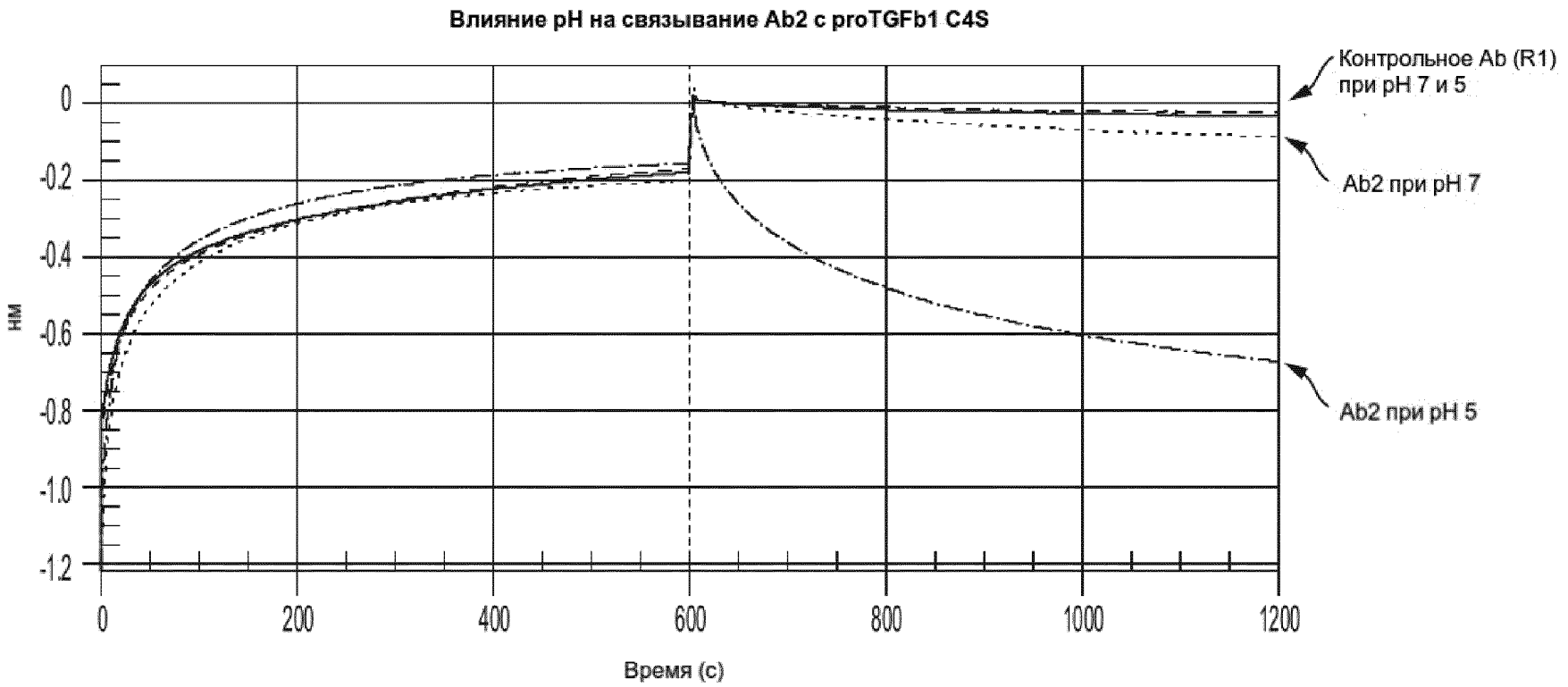
Вводили анти-PD-1;
окрашивали макрофагальным маркером (F4/80)

Фиг. 18B



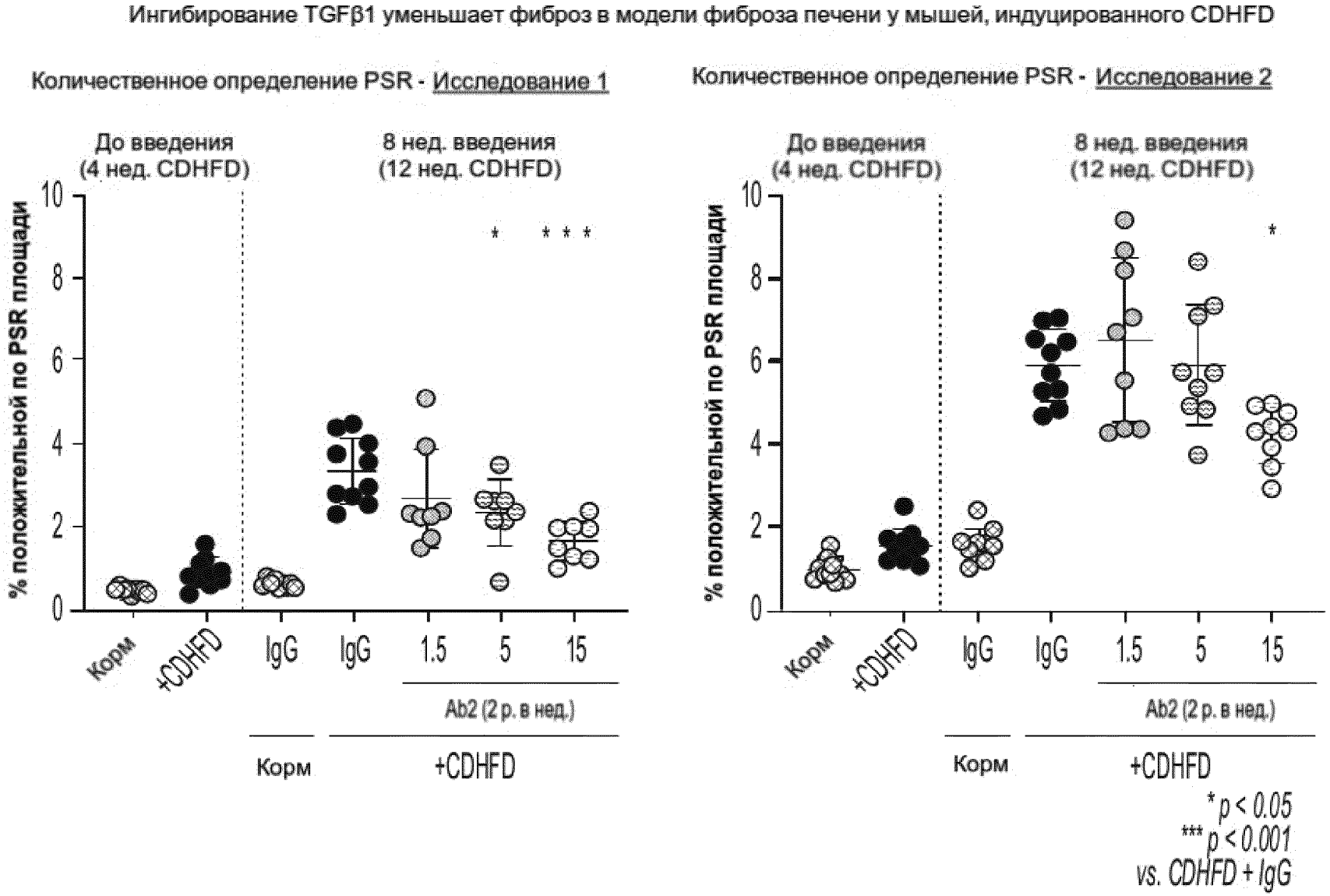
Вводили анти-PD-1 + контекстно-незав. ингибитор TGFβ1;
окрашивали макрофагальным маркером (F4/80)

Фиг. 18A, 18B

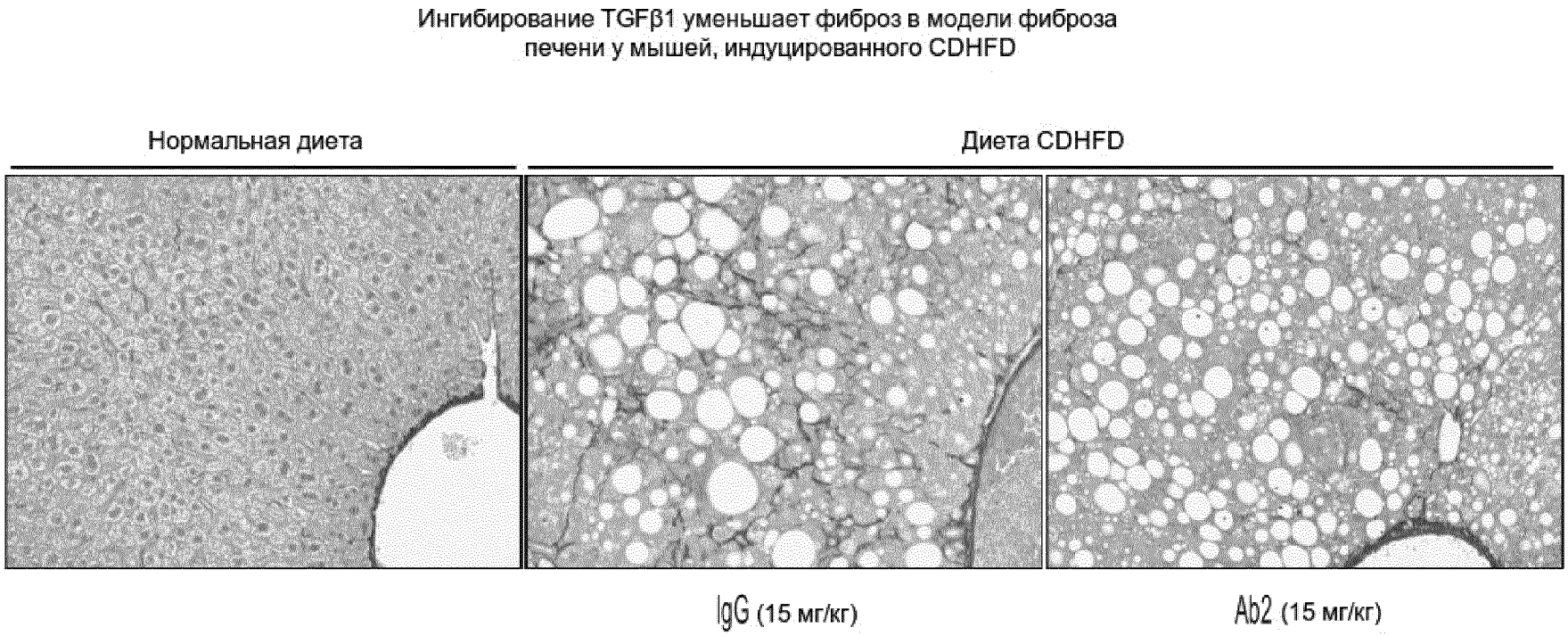


	Ab2	Контрольное Ab
$\frac{Kdis\ pH\ 5}{Kdis\ pH\ 7}$	$\frac{5.61e\text{-}3}{2.78e\text{-}3} = 2.02$	$\frac{3.69e\text{-}3}{4.38e\text{-}3} = 0.84$

Фиг. 19

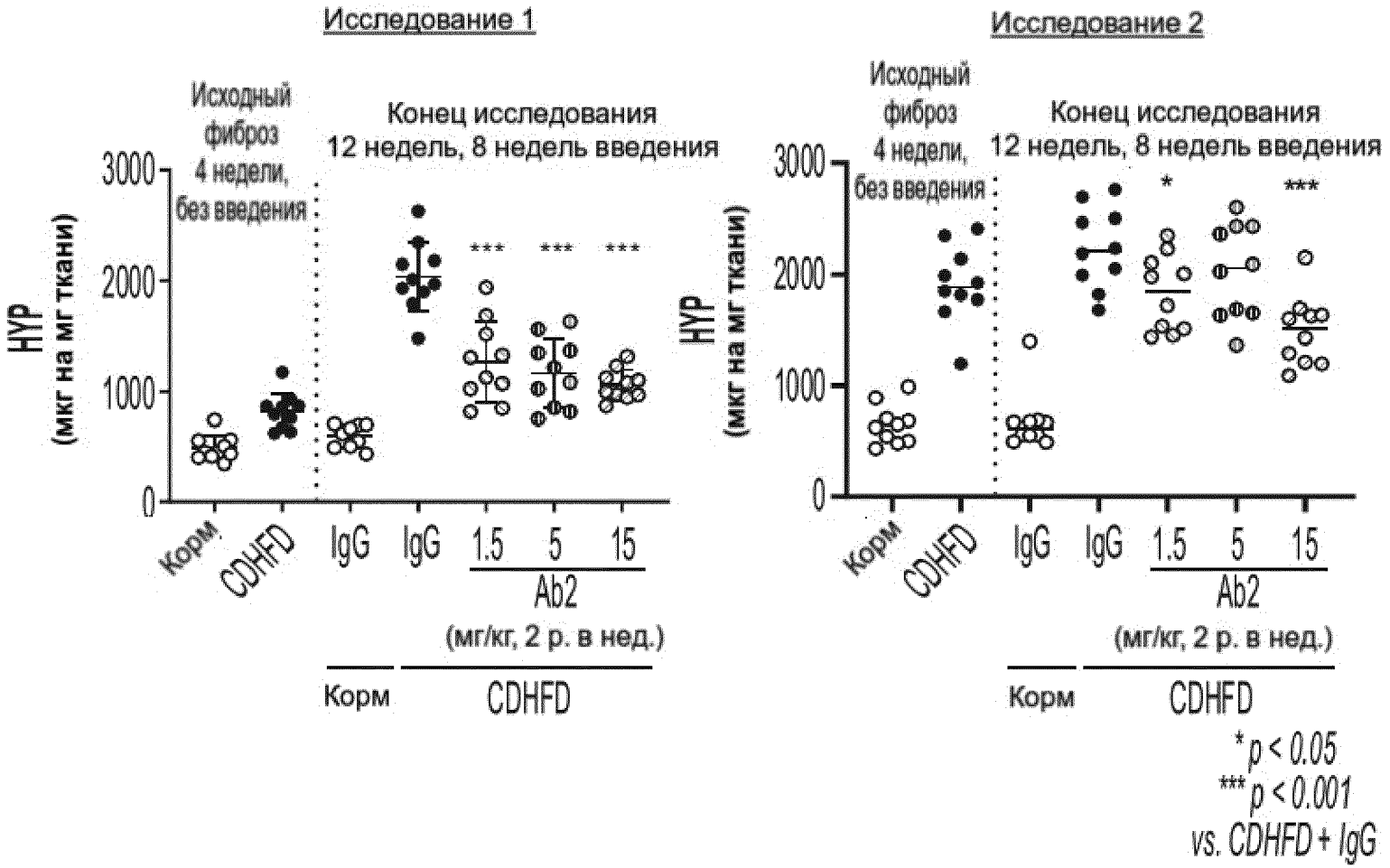

Ингибирование TGFβ1 уменьшает фиброз в модели фиброза печени у мышей, индуцированного CDHFD
Количественное определение PSR - Исследование 1
До введения
(4 нед. CDHFD)
8 нед. введения
(12 нед. CDHFD)
% положительной по PSR площади
Корм
+CDHFD
IgG
IgG
1.5
5
15
Ab2 (2 р. в нед.)
Корм
+CDHFD
Количественное определение PSR - Исследование 2
До введения
(4 нед. CDHFD)
8 нед. введения
(12 нед. CDHFD)
% положительной по PSR площади
Корм
+CDHFD
IgG
IgG
1.5
5
15
Ab2 (2 р. в нед.)
Корм
+CDHFD
* p < 0.05
*** p < 0.001
vs. CDHFD + IgG

Фиг. 20

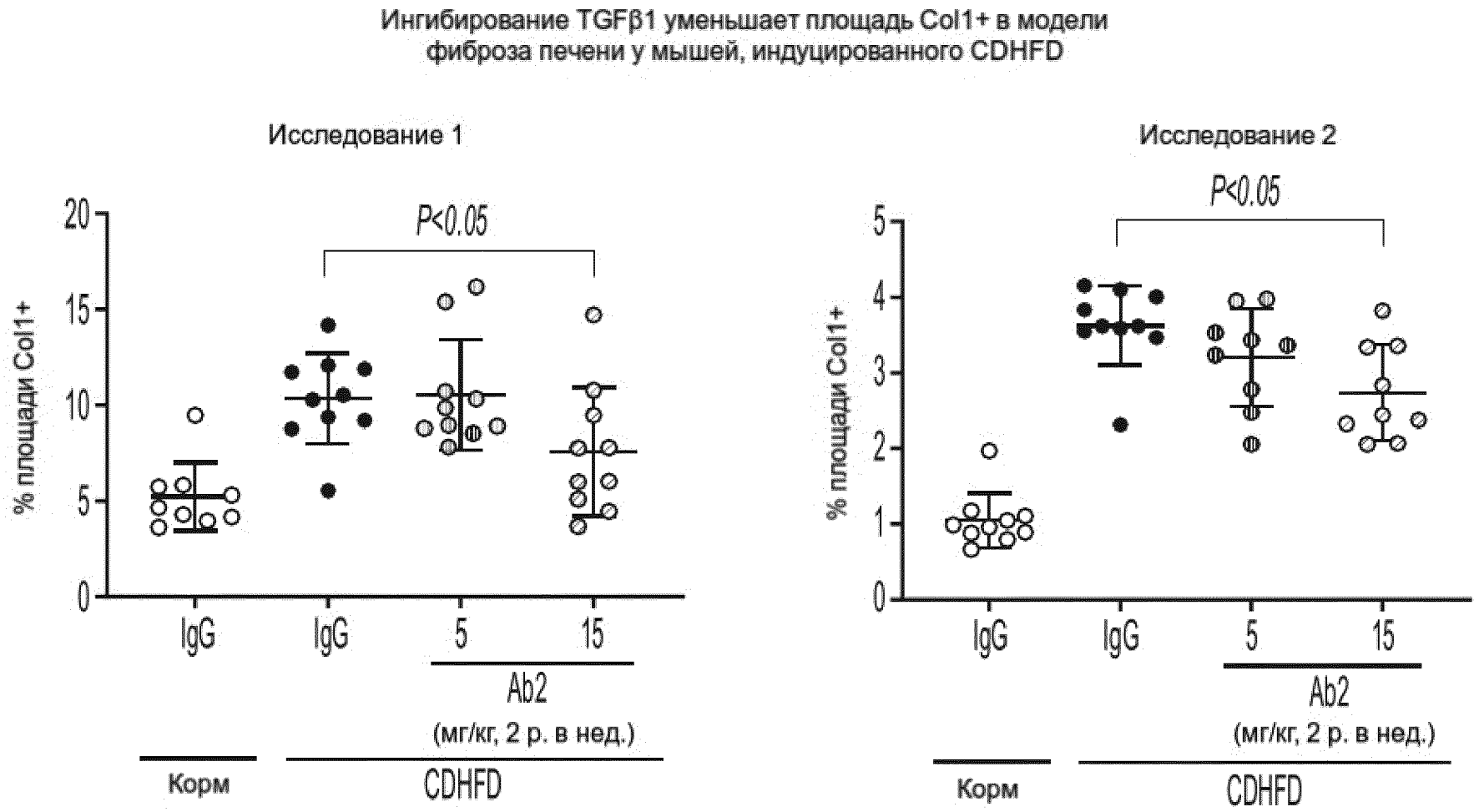

Ингибирование TGFβ1 уменьшает фиброз в модели фиброза печени у мышей, индуцированного CDHFD
Нормальная диета
Диета CDHFD
IgG (15 мг/кг)
Ab2 (15 мг/кг)

Фиг. 21

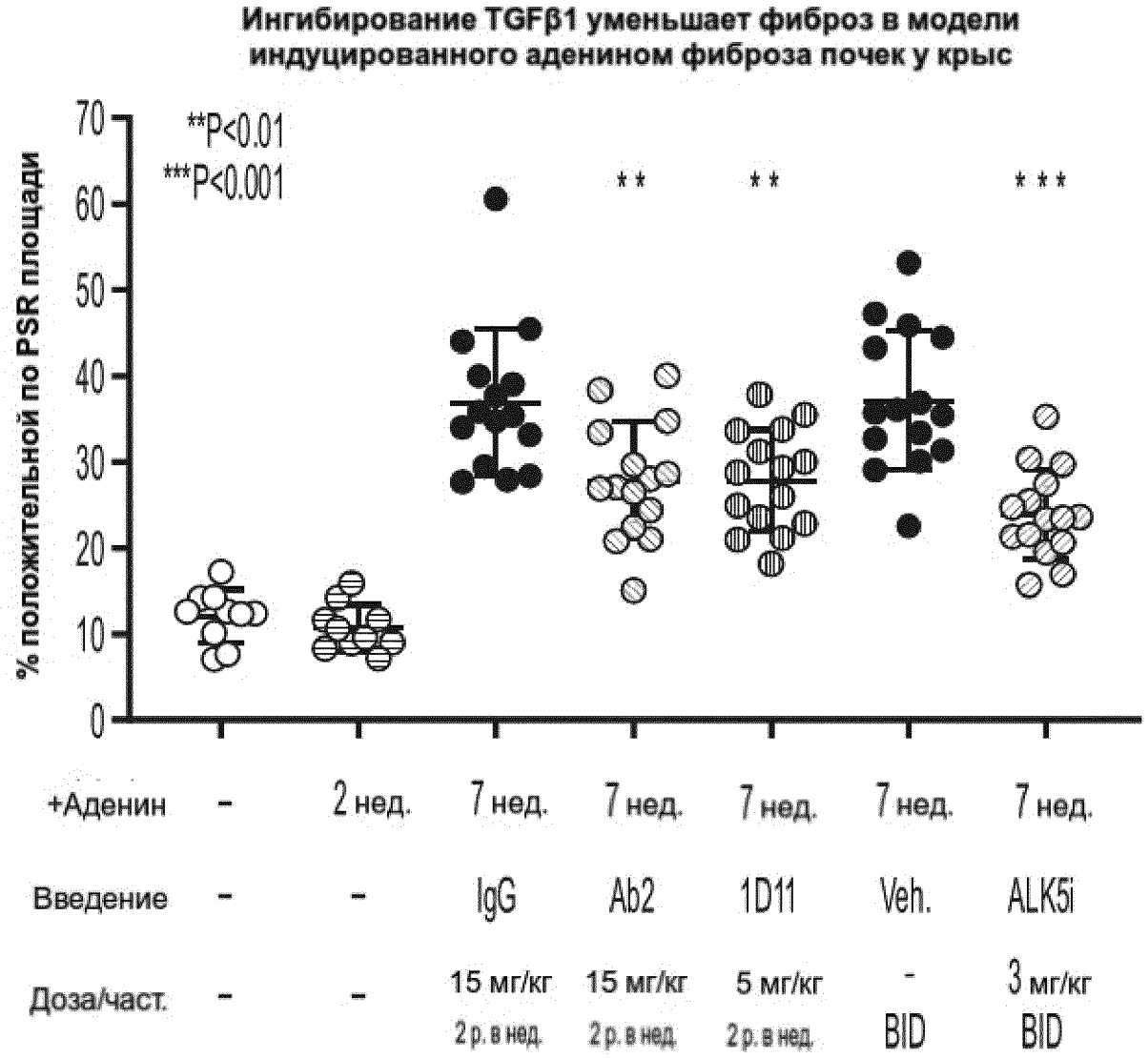
Антифибротический эффект ингибирования TGFβ1 в модели фиброза печени у мышей, индуцированного CDHFD, по содержанию гидроксипролина в печени



Фиг. 22

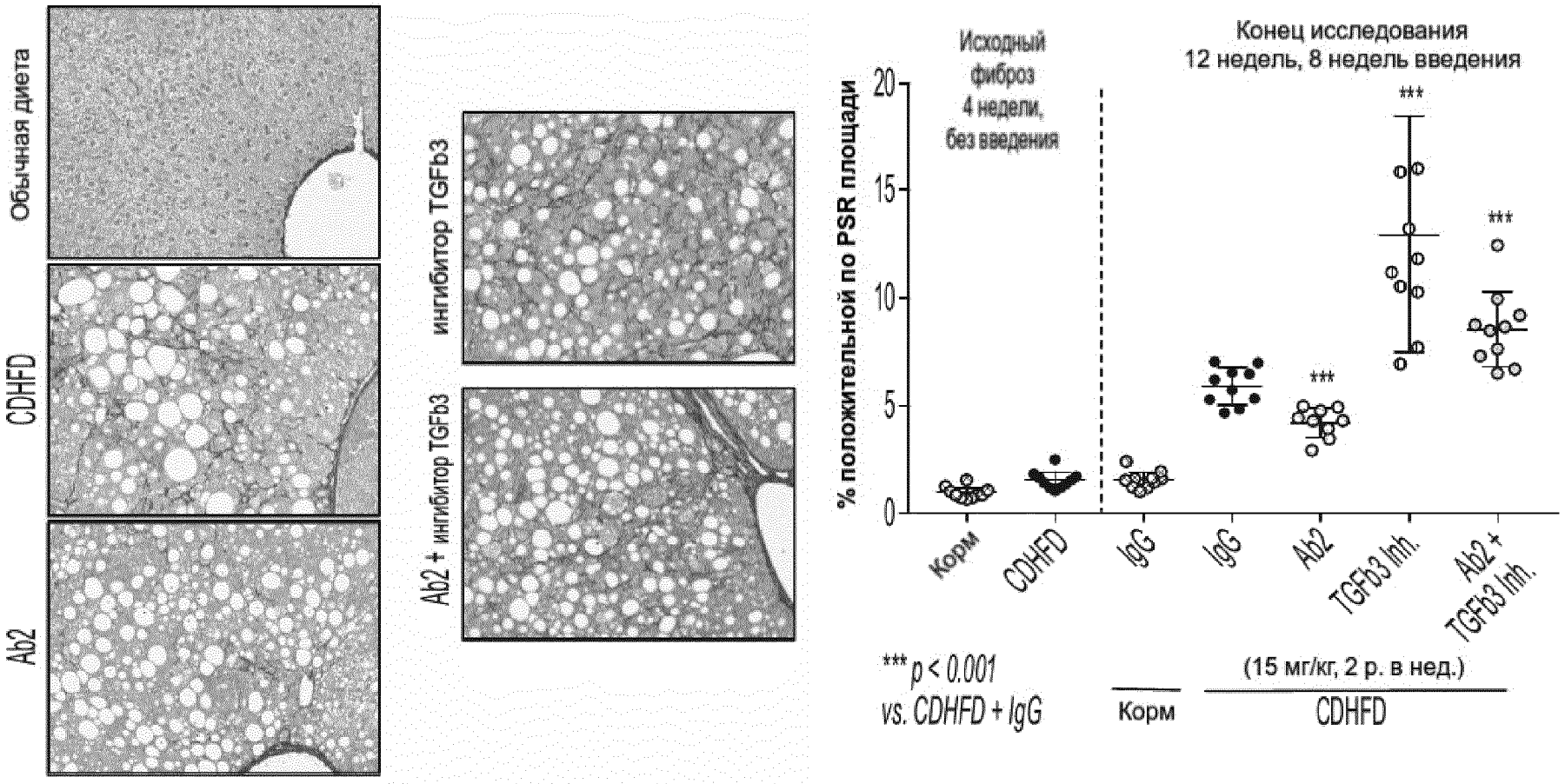

Ингибирование TGFβ1 уменьшает площадь Col1+ в модели фиброза печени у мышей, индуцированного CDHFD
Исследование 1
% площади Col1+
P<0.05
IgG
IgG
5
15
Ab2
(мг/кг, 2 р. в нед.)
Корм
CDHFD
Исследование 2
% площади Col1+
P<0.05
IgG
IgG
5
15
Ab2
(мг/кг, 2 р. в нед.)
Корм
CDHFD

Фиг. 23

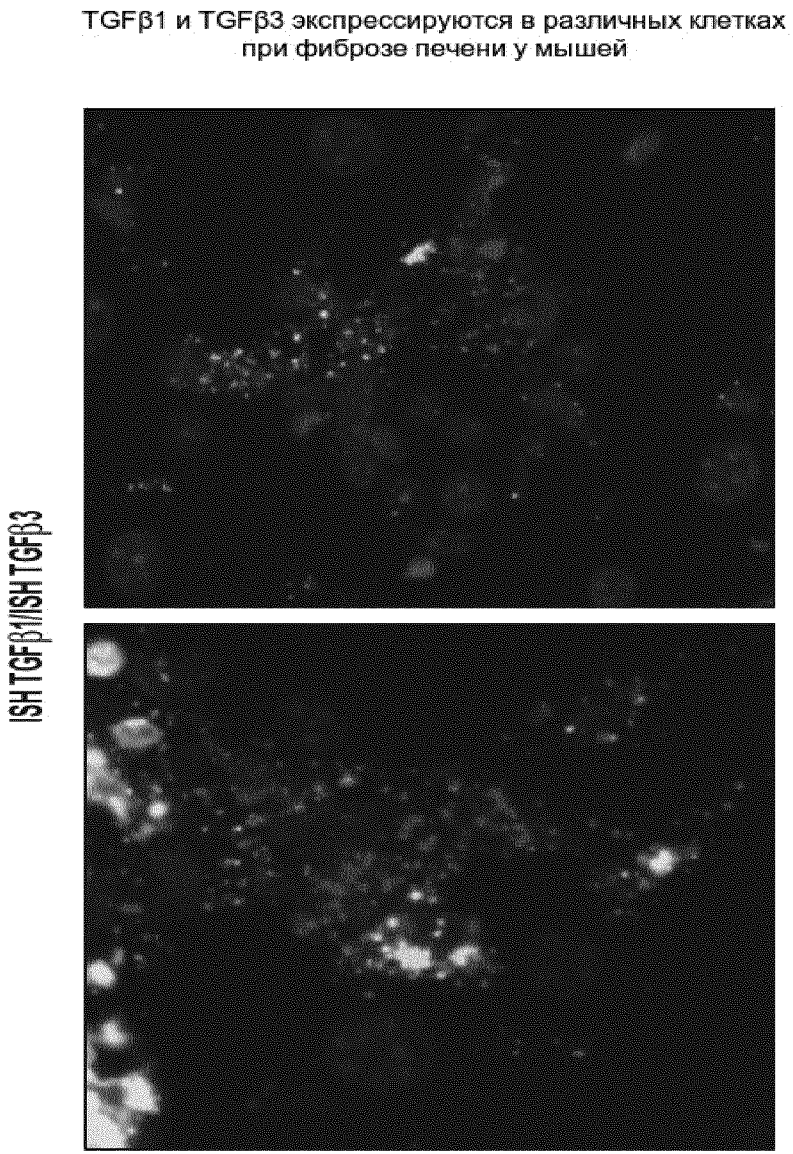

Ингибирование TGFβ1 уменьшает фиброз в модели индуцированного аденином фиброза почек у крыс
% положительной по PSR площади
70
60
50
40
30
20
10
0
**P<0.01
***P<0.001
**
**
***
+Аденин - 2 нед. 7 нед. 7 нед. 7 нед. 7 нед. 7 нед.
Введение - - IgG Ab2 1D11 Veh. ALK5i
Доза/част. - - 15 мг/кг 2 р. в нед. 15 мг/кг 2 р. в нед. 5 мг/кг 2 р. в нед. - BID 3 мг/кг BID

Фиг. 24

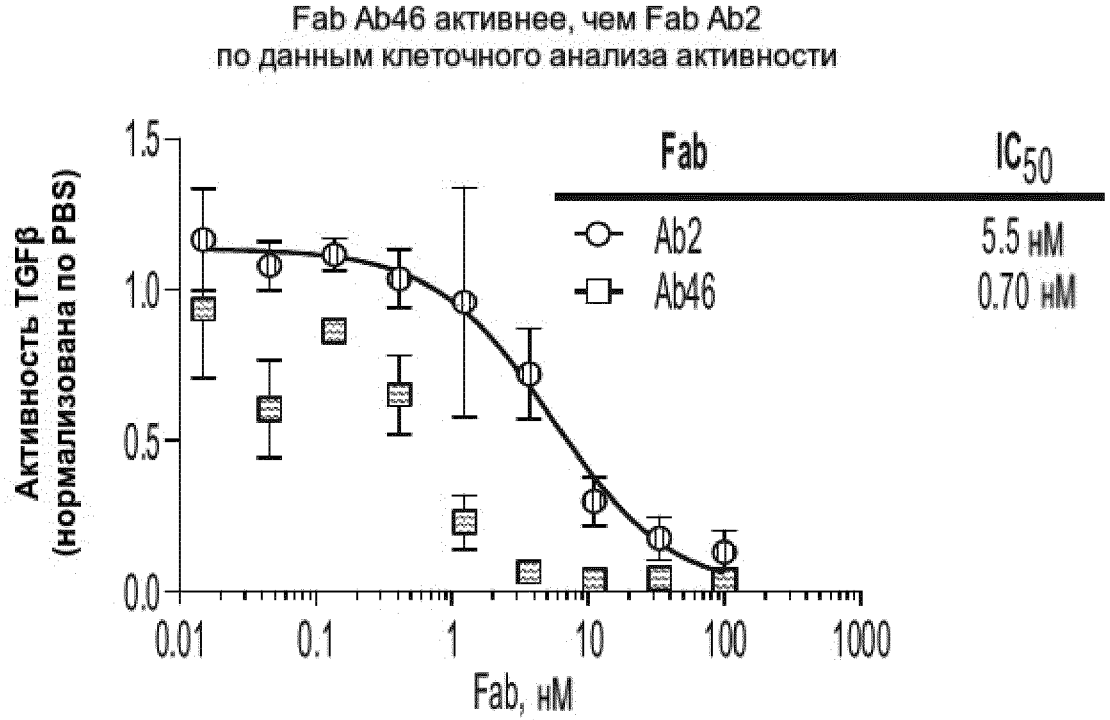
TGFβ3-селективный ингибитор усиливает фиброз и подавляет антифибротические эффекты TGFβ1-селективного ингибитора в модели на мышах на CDHFD



Фиг. 25

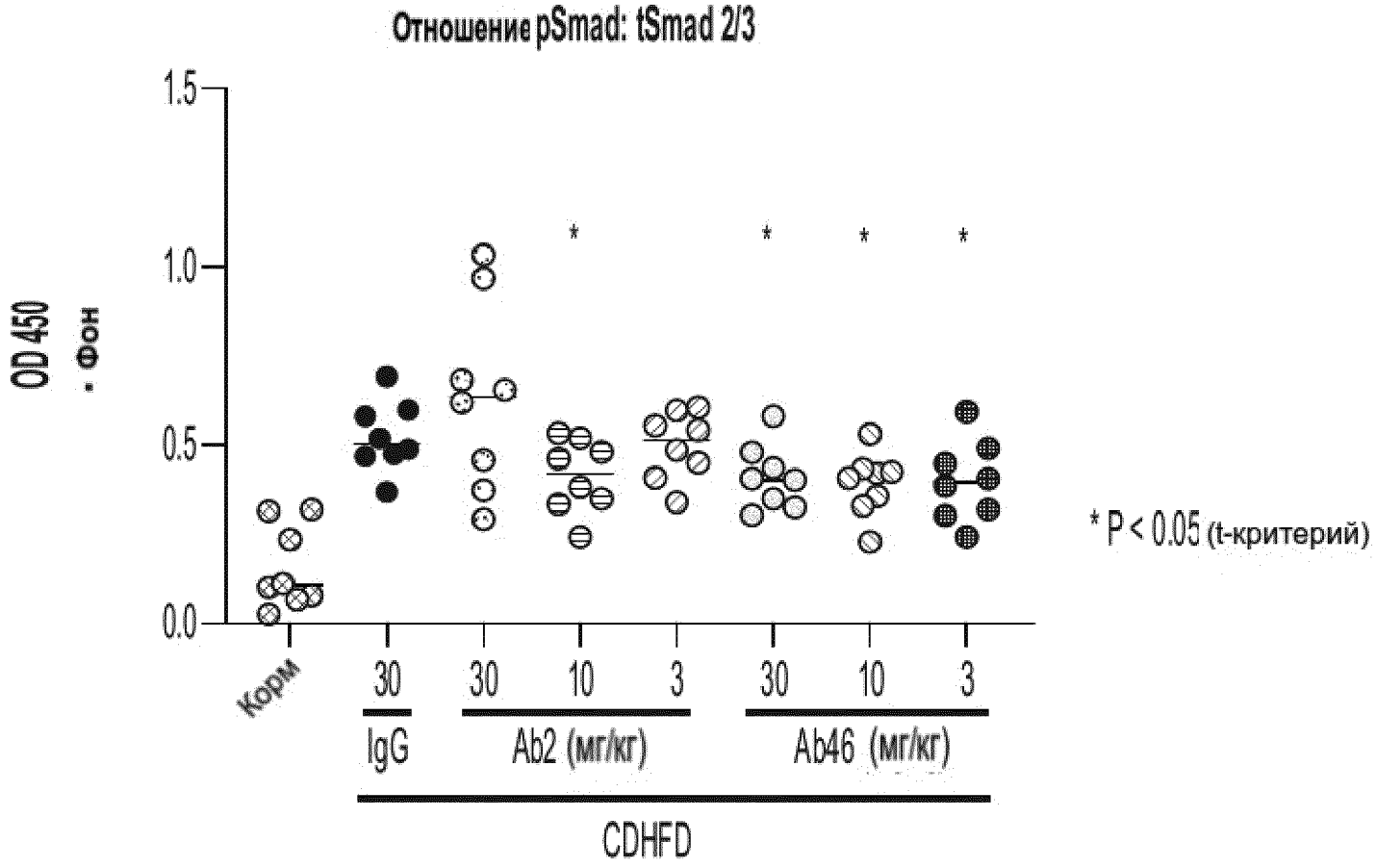

TGFβ1 и TGFβ3 экспрессируются в различных клетках
при фиброзе печени у мышей
ISH TGFβ1/ISH TGFβ3

Фиг. 26

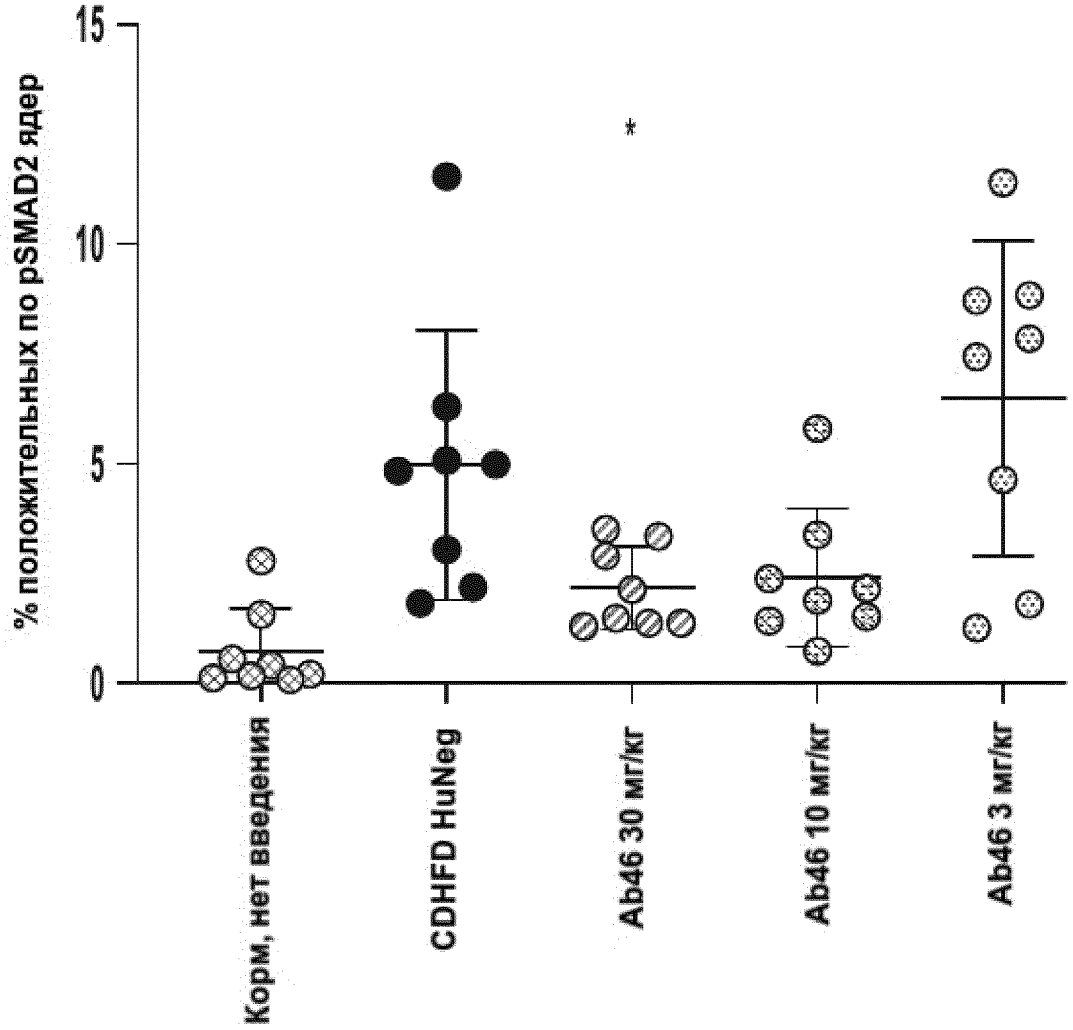

Fab Ab46 активнее, чем Fab Ab2
по данным клеточного анализа активности
Активность TGFβ
(нормализована по PBS)
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01
0.1
1
10
100
1000
Fab, нМ
Fab
IC50
Ab2
5.5 нМ
Ab46
0.70 нМ

Фиг. 27

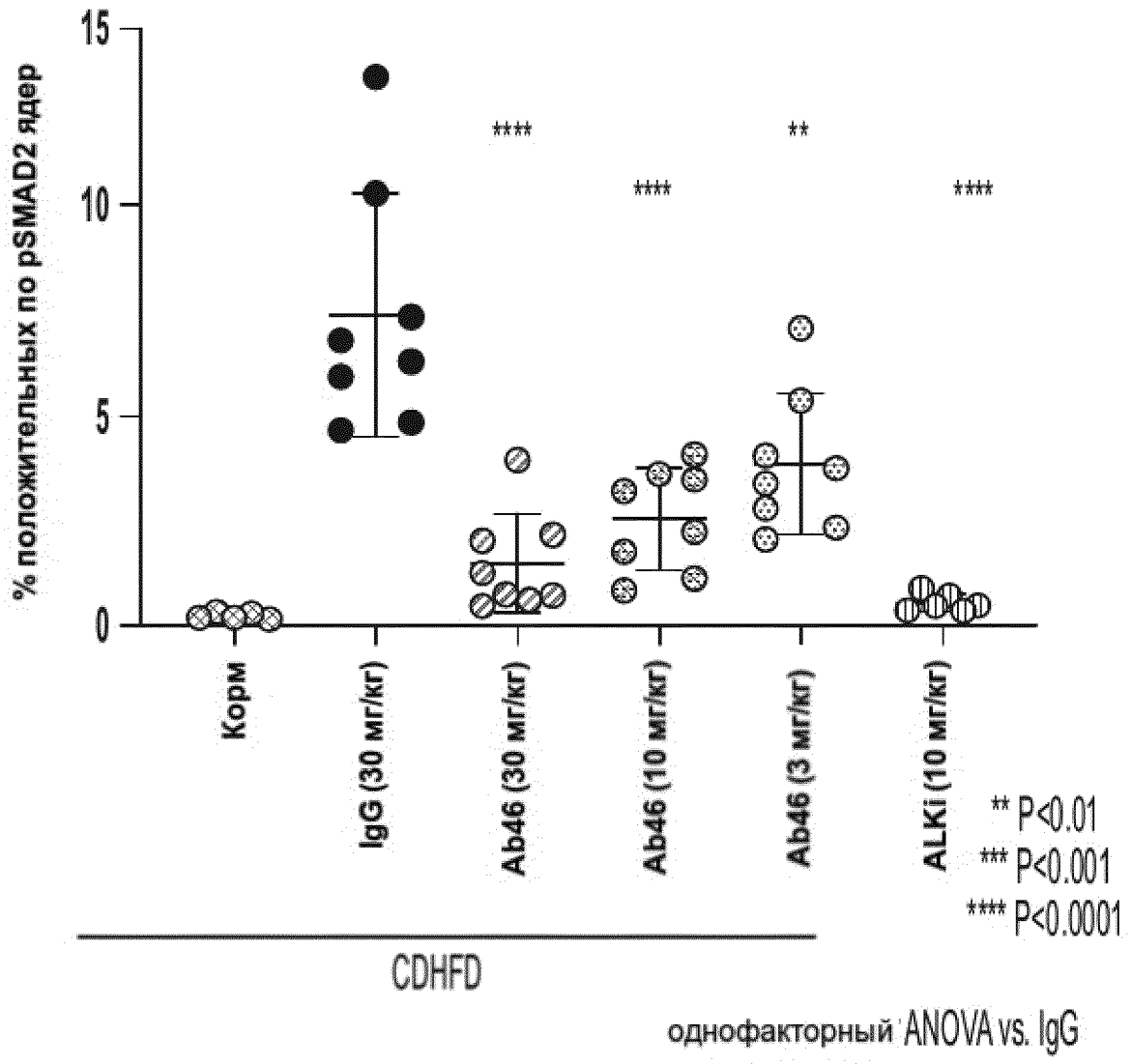
Ab46 подавляет фосфорилированные Smad2/3 при всех протестированных дозах в модели на мышах на CDHFD



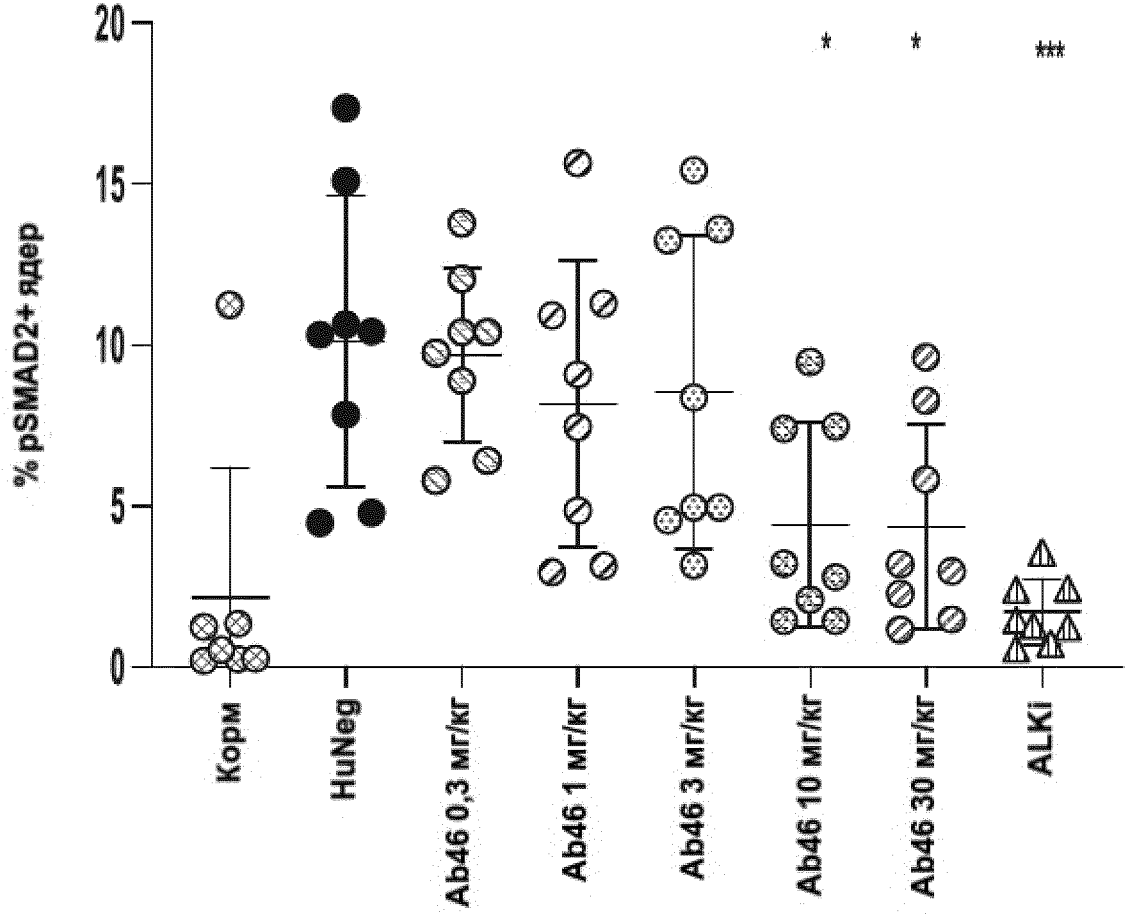
Фиг. 28


% положительных по pSMAD2 ядер
15
10
5
0
*
Корм, нет введения
CDHFD HuNeg
Ab46 30 мг/кг
Ab46 10 мг/кг
Ab46 3 мг/кг
*P<0,05 по t-критерию отн. контрольного IgG HuNeg

Фиг. 29


% положительных по pSMAD2 ядер
15
10
5
0
****
****
**
****
Корм
IgG (30 мг/кг)
Ab46 (30 мг/кг)
Ab46 (10 мг/кг)
Ab46 (3 мг/кг)
ALKi (10 мг/кг)
** P<0.01
*** P<0.001
**** P<0.0001
CDHFD
однофакторный ANOVA vs. IgG

Фиг. 30



* P < 0.05
*** P < 0.001
T-критерий отн. группы IgG

Фиг. 31