

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293339** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.04

(22) Дата подачи заявки
2021.06.11

(51) Int. Cl. **C07K 14/71** (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 14/495 (2006.01)

(54) СРЕДСТВА, СВЯЗЫВАЮЩИЕ ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ ФАКТОР РОСТА БЕТА (TGFβ), И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **63/038,290**

(32) **2020.06.12**

(33) **US**

(86) **PCT/CA2021/050795**

(87) **WO 2021/248247 2021.12.16**

(71) Заявитель:

**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
ТиджиЭф БЕТА ИНК. (CA)**

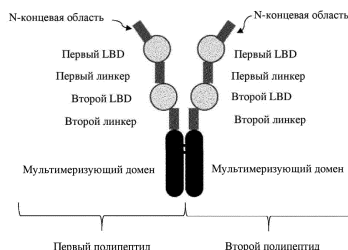
(72) Изобретатель:

**О'Коннор Маурин, Тремблей Джилс,
Денис Жан-Франсуа (CA), Ганеш
Ваннакамбади К. (US)**

(74) Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.,
Угрюмов В.М., Джермакян Р.В.,
Костюшенкова М.Ю., Строкова О.В.
(RU)**

(57) Предусмотрены тетравалентные ловушки на основе эктодомена рецептора TGFβ, характеризующиеся заданным профилем специфичности в отношении изоформы, для нейтрализации лигандов TGFβ, и способы их применения в лечении заболеваний и состояний, ассоциированных с TGFβ, в частности с TGFβ1 и TGFβ3. В частности, предусмотрены средства, связывающие TGFβ, разработанные для придания специфичности в отношении изоформы TGFβ, чтобы максимизировать терапевтическую эффективность при конкретных показаниях по заболеваниям при минимизации побочных эффектов. Средства, связывающие TGFβ, содержат два полипептида, собранных посредством мультимеризующего домена, при этом каждый полипептид содержит два лиганд-связывающих домена рецептора TGFβII (TGFβR), связанных в виде дуплета, где линкеры выбраны для придания специфичности в отношении изоформы.



A1

202293339

202293339

A1

**СРЕДСТВА, СВЯЗЫВАЮЩИЕ ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ ФАКТОР РОСТА БЕТА
(TGFB), И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка заявляет преимущество предварительной заявки на патент США № 63/038290, поданной 12 июня 2020 года, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Настоящая заявка включает посредством ссылки во всей своей полноте машиночитаемую форму (CRF) перечня последовательностей, поданного вместе с ней. Текстовый файл перечня последовательностей, поданный вместе с заявкой, имеет название "14247-632-228_SEQ_LISTING.txt", был создан 7 июня 2021 года и имеет размер 247915 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к средствам, связывающим TGFβ, предусматривающим полученные из эктодомена рецептора TGFβ (TGFβR-ECD) слитые молекулы, и к путям их применения для связывания и нейтрализации лигандов TGFβ, в частности для лечения заболеваний или состояний, ассоциированных с TGFβ.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Трансформирующий фактор роста бета (TGFβ) является частью суперсемейства из более чем 30 лигандов, которые регулируют некоторые физиологические процессы, включая пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток. Колебание их уровней и/или нарушение передачи сигнала с их участием приводит к значительным патологическим эффектам. TGFβ был вовлечен в патогенез множества нарушений человека (Akhurst, R.J. и Nata, A., 2012; Akhurst, R.J., 2017). Например, лиганды TGFβ и активин играют важные патогенные роли во многих заболеваниях, включая фиброз и рак. Примеры TGFβ-ассоциированных нарушений включают гематологические злокачественные новообразования, солидные опухоли, состояния недостаточности костного мозга и широкий спектр нарушений, характеризующихся неконтролируемым фиброзом, таких как легочный фиброз, фиброз печени, почечный фиброз и фиброз сосудов, легочная артериальная гипертензия и системный склероз (SSc, также называемый склеродермией) (Nanthakumar, D.B. et al., 2015; Meng, X.-M. et al., 2016).

[0005] Постоянная активация передачи сигнала TGFβ играет центральную роль в патогенезе фиброза (Varga, J. и Whitfield, M.L., 2009). Каноническая передача сигнала TGFβ

стимулирует переход фибробластов в миофибробласты (Desmouliere, A. et al., 1993; Midgley, A.C. et al., 2013) и играет важную роль в продуцировании и отложении коллагена и других компонентов внеклеточного матрикса (ECM) (Prud'homme, G.J., 2007), а также в индукции других медиаторов, вовлеченных в фиброз (Todd, N.W. et al., 2015). У пациентов с фиброзным заболеванием, таким как склеродермия и идиопатический легочный фиброз (IPF), TGF β повышает отложение коллагена в коже и/или легком и стимулирует активацию превращения фибробластов в миофибробласты в коже (Prud'homme, G.J., 2007; Lafyatis, R., 2014; Kissin, E.Y. et al., 2006). Кроме того, неканонические пути TGF β также способствуют поддержанию фибротического фенотипа (Leask, A., 2008). Таким образом, путь передачи сигнала TGF β стал наиболее очевидной мишенью для терапевтического воздействия при фиброзе (Varga, J. and Whitfield, M.L., 2009; Hunzelmann, N. and Krieg, T., 2010; Varga, J. and Pasche, B., 2008).

[0006] TGF β также считается важнейшим регулятором прогрессирования опухоли и сверхэкспрессируется в большинстве типов опухолей. Отчасти он способствует опухолеобразованию посредством индукции эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) в эпителиальных опухолевых клетках, что приводит к агрессивному метастазированию. TGF β также способствует опухолеобразованию посредством действия в качестве мощного супрессора иммунного ответа в микроокружении опухоли. Фактически, TGF β признан одним из самых активных иммуносупрессивных факторов, присутствующих в микроокружении опухоли. TGF β принимает участие в дифференцировке, пролиферации и выживании многих типов иммунных клеток, включая дендритные клетки, макрофаги, NK-клетки, нейтрофилы, В-клетки и Т-клетки; таким образом, он модулирует как врожденный, так и адаптивный иммунитет. Важность TGF β в микроокружении опухоли подчеркивается данными, демонстрирующими, что в нескольких типах опухолей, включая меланому, опухоль легкого, поджелудочной железы, колоректальную опухоль, опухоль печени и молочной железы, повышенные уровни лиганда TGF β коррелируют с прогрессированием и рецидивом заболевания, метастазированием и смертностью. Поэтому значительные усилия были направлены на разработку противоопухолевых терапевтических подходов, которые предусматривают подавление TGF β . Эти подходы включают применение слитых полипептидов на основе эктодомена рецептора TGF β , который связывает или "захватывает" лиганд TGF β (см., например, WO01/83525, WO2005/028517, WO2008/113185, WO2008/157367, WO2010/0031168, WO2010/099219, WO2012/071649, WO2012/142515, WO2013/000234, WO2018/158727, US5693607, US2005/0203022, US2007/0244042, US8318135, US8658135, US8815247, US2015/0225483 и US2015/0056199).

[0007] Один из подходов к разработке терапевтических средств, которые подавляют функцию $TGF\beta$, заключался в применении антител или растворимых рецепторов-приманок (также называемых ловушками лигандов на основе эктодомена рецептора (ECD)) для связывания и секвестрации лиганда с блокированием таким образом доступа лиганда к его рецепторам клеточной поверхности. В целом, ловушки на основе ECD рецептора представляют собой класс терапевтических средств, которые способны селективно секвестрировать лиганды и которые могут быть оптимизированы с применением подходов белковой инженерии.

[0008] Ранее было показано, что однопочечные бивалентные ловушки $TGF\beta$, содержащие два эктодомена рецептора $TGF\beta$ типа II ($TGF\beta RII$), соединенные в виде дуплета, способны нейтрализовывать представителей суперсемейства лигандов $TGF\beta$ (WO2008/113185, WO2010031168). В этих случаях бивалентность достигалась посредством ковалентного связывания двух эктодоменов $TGF\beta RII$ с применением внутренне неупорядоченных областей (IDR), которые фланкируют структурированный лиганд-связывающий домен эктодомена $TGF\beta RII$. Далее было показано, что активность повышается, если такие бивалентные дуплеты присоединяются в тандеме к мультимеризирующему домену, такому как Fc-компонент, на N- или C-конце (WO2017/037634, WO2018/158727).

[0009] На сегодняшний день большинство терапевтических подходов к нейтрализации $TGF\beta$ сосредоточены на изоформе $TGF\beta 1$, особенно в иммуноонкологии. Это связано с тем, что $TGF\beta 1$ является преимущественно экспрессируемой изоформой в иммунной системе (Li, M.O. et al., 2006), а также во многих типах опухолей человека (Martin, C.J. et al., 2020). Хотя предполагаемой мишенью обычно была изоформа $TGF\beta 1$, большинство разрабатываемых терапевтических средств обычно подавляют другие изоформы $TGF\beta$ с различной эффективностью. Например, фрезолимуаб представляет собой моноклональное антитело, которое является пан-ингибитором всех трех изоформ $TGF\beta$. Хотя он нейтрализует все изоформы, он подавляет изоформу $TGF\beta 1$ в ~ 7 эффективнее, чем изоформу $TGF\beta 3$, и в ~ 14 раз эффективнее, чем изоформу $TGF\beta 2$ (Grutter, C. et al., 2008). Это моноклональное антитело было протестировано в клинических испытаниях на пациентах с раком (Morris, J.C. et al., 2014; Lacouture, M.E. and Morris, J.C., 2015) и на пациентах с гломерулосклерозом (Vincenti, F. et al., 2017).

[0010] Изоформа $TGF\beta 2$ вовлечена в сердечный гомеостаз (Roberts, A.B. et al., 1992; Herbertz, S. et al., 2015), контроль состояния покоя опухоли (Bragado, P. et al., 2013) и положительную регуляцию гемопоеза (Langer, J.C. et al., 2004), что позволяет

предположить, что эта изоформа не должна подвергаться нейтрализации, поскольку она играет полезные роли.

[0011] Следовательно, было бы полезно обеспечить ловушки на основе TGF β RII-ECD, характеризующиеся заданной специфичностью в отношении изоформы, чтобы
5 максимизировать терапевтическую эффективность при конкретных показаниях по заболеваниям при минимизации нежелательных эффектов. В частности, может быть полезным обеспечение ловушек, которые нейтрализуют TGF β 3 с эффективностью, сходной с эффективностью TGF β 1.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0012] В данном документе предусмотрены тетравалентные ловушки на основе эктодомена рецептора TGF β , характеризующиеся заданным профилем специфичности в отношении изоформы, для нейтрализации лигандов TGF β , и способы их применения в лечении заболеваний и состояний, ассоциированных с TGF β . Тетравалентные средства, связывающие TGF β , предусмотренные в данном документе, содержат два полипептида,
15 собранных посредством мультимеризующего домена, при этом каждый полипептид содержит два лиганд-связывающих домена рецептора TGF β II (TGF β R), связанных в виде дуплета. Средства, связывающие TGF β , предусмотренные в данном документе, были разработаны для придания специфичности в отношении изоформы TGF β , чтобы максимизировать терапевтическую эффективность при конкретных показаниях по
20 заболеваниям при минимизации побочных эффектов.

[0013] Настоящая технология основана, по меньшей мере частично, на понимании авторами настоящего изобретения того, что ловушка лигандов TGF β со специфичностью в отношении изоформы, которая отличается от других известных средств, находящихся в разработке, может быть выгодна для лечения определенных TGF β -ассоциированных
25 заболеваний и состояний. Последние сообщения указывают на важную роль изоформы TGF β 3 в определенных TGF β -ассоциированных состояниях, таких как фиброз. Например, в недавнем сообщении TGF β 3 идентифицирован как ключевая терапевтическая мишень при фиброзе почек посредством демонстрации того, что специфическая отрицательная регуляция TGF β 3 с помощью miR-29 противодействует почечному фиброзу (Wang, H. et al.,
30 2019). Важная роль изоформы TGF β 3 в иммунитете также предполагалась в недавних сообщениях о продуцировании TGF β 3 иммунными клетками (Komai, I.D. and Okamura, T., 2018). Что касается SSc, то полногеномное исследование ассоциаций у афроамериканских пациентов позволило идентифицировать TGF β 3 в качестве нового гена, определяющего предрасположенность к SSc (Gourh, P. et al., 2017).

[0014] Что касается TGF β 2, то участие этой изоформы в сердечном гомеостазе (Roberts, A.B. et al., 1992; Herbertz, S. et al., 2015), контроле состояния покоя опухоли (Bragado, P. et al., 2013) и положительной регуляции гемопоеза (Langer, J.C. et al., 2004) свидетельствует о том, что желательно избегать нейтрализации этой изоформы.

5 [0015] В совокупности эти данные позволяют предположить, что нейтрализация TGF β 1 и TGF β 3 в сходной степени может быть благоприятной для лечения определенных нарушений, особенно тех, в которых задействован TGF β 3. Достижение приблизительно равной степени подавления TGF β 1 и TGF β 3 может быть применимым в некоторых случаях для обеспечения эффективной нейтрализации как TGF β 1, так и TGF β 3, что может
10 предотвратить компенсаторные механизмы, которые могут возникнуть, когда одна из этих изоформ нейтрализуется предпочтительно, и/или что может максимизировать эффективность. Также желательно сходным образом подавлять TGF β 1 и TGF β 3 без нейтрализации передачи сигнала TGF β 2, поскольку может быть полезно избежать нейтрализации этой изоформы.

15 [0016] В широком аспекте в данном документе предусмотрены новые полипептидные конструкции, применимые для подавления эффекта изоформы трансформирующего фактора роста бета (TGF β). Полипептиды в соответствии с настоящим изобретением содержат TGF β -связывающую область и мультимеризующий домен, где N-конец мультимеризующего домена соединен с C-концом TGF β -связывающей области. TGF β -связывающая область содержит два домена, связывающих лиганд рецептора TGF β (TGF β R-LBD), соединенные вместе посредством первого линкера и соединенные с мультимеризующим доменом посредством второго линкера. В другом широком аспекте предусмотрены средства, связывающие TGF β , содержащие две такие полипептидные цепи, собранные посредством мультимеризующих доменов, с образованием таким образом
20 тетравалентной молекулы, характеризующейся конкретной специфичностью подавления в отношении лигандов TGF β (TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3).

[0017] Без ограничения теорией, настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на обнаружении того, что модификация одного или нескольких линкеров в такой ловушке лиганда TGF β (например, линкера, соединяющего два TGF β R-LBD вместе, и/или
30 линкера, соединяющего TGF β R-LBD с мультимеризующим доменом) дифференциально влияет на эффективность подавления связывающего средства в отношении различных изоформ TGF β . В данном документе показано, что в некоторых случаях модификация одного или обоих линкеров может снизить или уравнивать соотношение IC₅₀ TGF β 3:TGF β 1 (что указывает на сходную или одинаковую эффективность подавления в отношении обеих

изоформ) без повышения нежелательного подавления $TGF\beta 2$ и без значительного снижения общей эффективности (например, IC_{50} остается в низком пиколярном диапазоне).

[0018] Средства, связывающие $TGF\beta$, предусмотренные в данном документе, обычно содержат первый полипептид и второй полипептид, которые ассоциированы вместе посредством мультимеризующего домена, при этом каждый полипептид содержит в ориентации от N- к С-концу N-концевую область; первый лиганд-связывающий домен рецептора $TGF\beta$ (($TGF\beta R$ -LBD); первый линкер; второй $TGF\beta R$ -LBD; второй линкер и мультимеризующий домен. Вариант осуществления средства, связывающего $TGF\beta$, схематически показан на фиг. 1 (где показан вариант осуществления, в котором средство, связывающее $TGF\beta$, является гомодимером, т. е. первый и второй полипептиды являются одинаковыми). Первый полипептид и второй полипептид могут быть связаны друг с другом посредством их соответствующих мультимеризующих доменов, например, посредством дисульфидных связей (цистеиновых мостиков), спираль-спиральных взаимодействий и т. п.

[0019] Средства, связывающие $TGF\beta$, были разработаны по технологии по настоящему изобретению для снижения или выравнивания соотношения $IC_{50} TGF\beta 3:TGF\beta 1$. То есть они разработаны таким образом, чтобы демонстрировать сниженное преимущественное подавление $TGF\beta 1$ по сравнению с другими известными ловушками $TGF\beta$. Соответственно, средства, связывающие $TGF\beta$, предусмотренные в данном документе, характеризуются их профилем специфичности для подавления изоформ: в частности, относительная эффективность подавления изоформ $TGF\beta 1$ и $TGF\beta 3$ (выраженная в данном документе как соотношение $IC_{50} TGF\beta 3:TGF\beta 1$) составляет не более чем приблизительно 2,5:1, и активности обеих изоформ $TGF\beta 3$ и $TGF\beta 1$ подавляются с гораздо большей эффективностью, чем активность изоформы $TGF\beta 2$ (например, в пиколярном диапазоне в случае $TGF\beta 3$ и $TGF\beta 1$ и в нанолярном диапазоне в случае $TGF\beta 2$).

[0020] Кроме того, в некоторых вариантах осуществления полипептиды и средства, связывающие $TGF\beta$, разработанные по технологии по настоящему изобретению, могут обеспечивать определенные преимущества в дополнение к заданной специфичности в отношении изоформы. Например и без ограничения, полипептиды и средства, связывающие $TGF\beta$, могут обеспечивать улучшенную технологичность изготовления, например, за счет сниженного гликозилирования, повышенной гомогенности, простоты экспрессии и т. п. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления полипептиды и средства, связывающие $TGF\beta$, разработанные по технологии по настоящему изобретению, обеспечивают одно или несколько из следующих преимуществ относительно предшествующих средств, связывающих $TGF\beta$: улучшенный терапевтический эффект при

конкретных показаниях по заболеваниям, например, TGFβ3-опосредованным состояниям; сниженное гликозилирование; повышенная гомогенность; улучшенная технологичность изготовления и повышенный уровень продуцирования.

[0021] В некоторых вариантах осуществления полипептидов и средств, связывающих TGFβ, разработанных по технологии по настоящему изобретению, первый линкер и второй линкер разработаны таким образом, что они обеспечивают требуемую относительную специфичность подавления в отношении изоформы. Например, в некоторых вариантах осуществления значения длины первого линкера и второго линкера выбраны таким образом, что соотношение IC₅₀ TGFβ3:TGFβ1 составляет не более чем приблизительно 2,5:1, и активность изоформ как TGFβ3, так и TGFβ1, подавляется с гораздо большей эффективностью, чем активность изоформы TGFβ2 (например, в пикомолярном диапазоне в случае TGFβ3 и TGFβ1 и в наномолярном диапазоне в случае TGFβ2).

[0022] В некоторых вариантах осуществления полипептидов и средств, связывающих TGFβ, разработанных по технологии по настоящему изобретению, первый линкер и второй линкер выбраны таким образом, что соотношение IC₅₀ TGFβ3:TGFβ1 составляет приблизительно 2,5:1 или меньше. В некоторых вариантах осуществления соотношение IC₅₀ TGFβ3:TGFβ1 составляет менее чем приблизительно 2,5:1, приблизительно 2,3:1 или меньше, приблизительно 2:1 или меньше, приблизительно 1,8:1 или меньше, приблизительно 1,5:1 или меньше, приблизительно 1,3:1 или меньше, приблизительно 1,1:1 или меньше, приблизительно 1:1 или меньше, приблизительно 0,8:1 или меньше или приблизительно 0,5:1 или меньше. В некоторых вариантах осуществления соотношение IC₅₀ TGFβ3:TGFβ1 для средства, связывающего TGFβ, составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 2:1 или составляет приблизительно 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1 или 1,9:1. В конкретном варианте осуществления соотношение IC₅₀ TGFβ3:TGFβ1 для средства, связывающего TGFβ, составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1,5:1, или от приблизительно 1,4:1 до приблизительно 1,6:1, или приблизительно 1,4:1, 1,5:1 или 1,6:1. В некоторых таких вариантах осуществления средство, связывающее TGFβ, подавляет как активность изоформы TGFβ1, так и активность изоформы TGFβ3 с в по меньшей мере 20 раз, 100 раз, 200 раз, 300 раз, 400 раз, 500 раз, 600 раз, 700 раз, 800 раз, 900 раз или 1000 раз большей эффективностью, чем активность изоформы TGFβ2.

[0023] В некоторых вариантах осуществления первый линкер составляет 33 аминокислоты или меньше. В одном варианте осуществления длина первого линкера составляет от приблизительно 10 до 33 аминокислот. В вариантах осуществления длина первого линкера

может составлять от приблизительно 15 до 33 аминокислот или от приблизительно 18 до приблизительно 30 аминокислот. В одном варианте осуществления длина первого линкера составляет 16, 18, 30 или 32 аминокислоты. В конкретном варианте осуществления длина первого линкера составляет 16 аминокислот. В другом конкретном варианте осуществления

5 длина первого линкера составляет 18 аминокислот. В другом конкретном варианте осуществления длина первого линкера составляет 30 аминокислот. В другом конкретном варианте осуществления длина первого линкера составляет 32 аминокислоты.

[0024] В некоторых вариантах осуществления второй линкер составляет 10 аминокислот или больше. В одном варианте осуществления длина второго линкера составляет от

10 приблизительно 10 до приблизительно 35 аминокислот. В вариантах осуществления длина второго линкера может составлять от приблизительно 10 до приблизительно 34 или от приблизительно 15 до приблизительно 34 аминокислот. В одном варианте осуществления длина второго линкера составляет 16, 30, 32 или 34 аминокислоты. В конкретном варианте осуществления длина второго линкера составляет 30 аминокислот. В другом конкретном

15 варианте осуществления длина второго линкера составляет 16 аминокислот. В другом конкретном варианте осуществления длина второго линкера составляет 32 аминокислоты. В другом конкретном варианте осуществления длина второго линкера составляет 34 аминокислоты.

[0025] В одном варианте осуществления первый линкер составляет 18 аминокислот, и

20 второй линкер составляет 16 аминокислот. В другом варианте осуществления первый линкер составляет 18 аминокислот, и второй линкер составляет 30 аминокислот. В другом варианте осуществления первый линкер составляет 18 аминокислот, и второй линкер составляет 10 аминокислот. В другом варианте осуществления первый линкер составляет 18 аминокислот, и второй линкер составляет 32 аминокислоты. В другом варианте

25 осуществления первый линкер составляет 18 аминокислот, и второй линкер составляет 34 аминокислоты. В другом варианте осуществления первый линкер составляет 16 аминокислот, и второй линкер составляет 18 аминокислот. В другом варианте осуществления первый линкер составляет 16 аминокислот, и второй линкер составляет 16 аминокислот. В другом варианте осуществления первый линкер составляет 16

30 аминокислот, и второй линкер составляет 30 аминокислот. В другом варианте осуществления первый линкер составляет 16 аминокислот, и второй линкер составляет 32 аминокислоты. В другом варианте осуществления первый линкер составляет 26 аминокислот, и второй линкер составляет 26 аминокислот. В другом варианте осуществления первый линкер составляет 32 аминокислоты, и второй линкер составляет 32

аминокислоты. В другом варианте осуществления первый линкер составляет 32 аминокислоты, и второй линкер составляет 34 аминокислоты. Следует понимать, что возможны многие другие изменения, при условии, что достигается требуемая специфичность подавления в отношении изоформы.

5 **[0026]** В некоторых вариантах осуществления один или несколько из первого линкера и второго линкера предусматривают линкер на основе IDR, вариант линкера на основе IDR, гибридный линкер, вариант гибридного линкера, усеченный линкер, вариант усеченного линкера или удлиненный линкер, раскрытые в данном документе, или состоят из них. Например, один или несколько из первого линкера и второго линкера могут независимо
10 содержать аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 4 или 8-26, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоять из нее. В некоторых вариантах осуществления первый линкер содержит аминокислотную
15 последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 21, 22, 23 и 26, или последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления второй линкер содержит аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 4,
20 9, 11, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25 и 26, или последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее.

[0027] В типичном варианте осуществления первый линкер содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 12, или состоит из нее, и/или второй
25 линкер содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, или состоит из нее. В другом типичном варианте осуществления первый линкер содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 8, или состоит из нее, и/или второй линкер содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 9, или состоит из нее. Следует понимать, что охватываются другие варианты
30 осуществления с применением комбинаций линкеров, предусмотренных в данном документе, при условии, что достигается требуемая специфичность в отношении подавления изоформы.

[0028] В некоторых вариантах осуществления полипептидов и средств, связывающих TGF β , разработанных по технологии по настоящему изобретению, N-концевая область

содержит линкер на основе IDR, вариант линкера на основе IDR, гибридный линкер, вариант гибридного линкера, усеченный линкер, вариант усеченного линкера или удлинённый линкер или состоит из них. Например, N-концевая область может содержать аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 3, или

5 последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоять из нее.

[0029] В некоторых вариантах осуществления полипептидов и средств, связывающих TGF β , разработанных по технологии по настоящему изобретению, первый TGF β R-LBD

10 и/или второй TGF β R-LBD содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2, или последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее. В некоторых вариантах осуществления первый TGF β R-LBD и второй TGF β R-LBD являются одинаковыми или практически

15 одинаковыми. В других вариантах осуществления первый TGF β R-LBD и второй TGF β R-LBD могут характеризоваться разными аминокислотными последовательностями.

[0030] В некоторых вариантах осуществления полипептидов и средств, связывающих TGF β , разработанных по технологии по настоящему изобретению, мультимеризующий домен обеспечивает димеризацию двух полипептидов в соответствии с настоящим

20 изобретением нековалентным образом, например, посредством спираль-спиральных взаимодействий и т. п.

[0031] В других вариантах осуществления мультимеризующий домен обеспечивает димеризацию двух полипептидов в соответствии с настоящим изобретением ковалентным образом, например, посредством образования дисульфидного мостика и т. п.

[0032] В некоторых вариантах осуществления мультимеризующий домен содержит одну или несколько константных областей антитела, например, второй константный домен (C_H2) и/или третий константный домен (C_H3) тяжелой цепи антитела или Fc-область тяжелой цепи антитела. Антитело может представлять собой, например и без ограничения, антитело IgG, такое как антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В конкретных вариантах осуществления

30 антитело представляет собой антитело человека, например, мультимеризующий домен содержит константную область тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления мультимеризующий домен характеризуется по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере

99% идентичностью последовательности с константной областью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В конкретном варианте осуществления мультимеризующий домен содержит Fc-область антитела IgG1 человека или состоит из нее. В другом конкретном варианте осуществления мультимеризующий домен содержит Fc-область антитела IgG4 человека или состоит из нее.

[0033] В некоторых вариантах осуществления мультимеризующий домен содержит один или несколько остатков цистеина для сшивания первой полипептидной конструкции со второй полипептидной конструкцией. Например, мультимеризующий домен может содержать по меньшей мере два остатка цистеина для образования дисульфидного мостика между двумя полипептидными конструкциями с образованием таким образом димера.

[0034] В некоторых вариантах осуществления мультимеризующий домен конструируют для снижения агрегации или для модуляции стабильности димера или мультимера полипептидной конструкции. Например, Fc-область может содержать одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают агрегацию и/или повышают стабильность средства, связывающего TGF β , по сравнению со встречающимися в природе Fc-последовательностями. В некоторых вариантах осуществления мультимеризующий домен выбран для обеспечения одной или нескольких эффекторных функций, таких как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), активация комплемента (комплементзависимая цитотоксичность или CDC), опсонизация и т. п.

[0035] В некоторых вариантах осуществления мультимеризующий домен содержит аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 49-80, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее. В конкретном варианте осуществления мультимеризующий домен содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:49, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее. В другом конкретном варианте осуществления мультимеризующий домен содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:50, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее.

[0036] В некоторых вариантах осуществления полипептидов и средств, связывающих

TGFβ, разработанных по технологии по настоящему изобретению, область, связывающая TGFβ (содержащая N-концевой домен, два LBD и два линкера), содержит последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 27-48, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее. В конкретном варианте осуществления TGFβ-связывающая область содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 27, или состоит из нее. В другом конкретном варианте осуществления TGFβ-связывающая область содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 29, или состоит из нее. В другом конкретном варианте осуществления TGFβ-связывающая область содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, или состоит из нее. В другом конкретном варианте осуществления TGFβ-связывающая область содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 41, или состоит из нее.

[0037] В другом конкретном варианте осуществления TGFβ-связывающая область содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 40, или состоит из нее.

[0038] В некоторых вариантах осуществления полипептидов и средств, связывающих TGFβ, разработанных по технологии по настоящему изобретению, полипептидная конструкция содержит аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 81-103 и 105, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее. В конкретном варианте осуществления полипептидная конструкция содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 81, или состоит из нее. В другом конкретном варианте осуществления полипептидная конструкция содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 84, или состоит из нее. В другом конкретном варианте осуществления полипептидная конструкция содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 87, или состоит из нее.

[0039] В другом конкретном варианте осуществления полипептидная конструкция содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 96, или состоит из нее.

[0039] В другом конкретном варианте осуществления полипептидная конструкция содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 95, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере

90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее. В другом конкретном варианте осуществления полипептидная конструкция содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 95, или состоит из нее.

5 **[0040]** В некоторых вариантах осуществления полипептидная конструкция, предусмотренная в данном документе, представляет собой полипептидную конструкцию, содержащую от N-конца к С-концу: (i) аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:40, и (ii) Fc-область IgG1 человека.

[0041] В некоторых вариантах осуществления согласно технологии по настоящему изобретению средство, связывающее TGF β , является гетеродимерным, то есть первый и второй полипептиды являются различными. В таких вариантах осуществления первый и второй полипептиды могут различаться одной или несколькими областями или доменами, например, последовательностью первого линкера, второго линкера, LBD, мультимеризующего домена и т. п., а также их комбинациями. Таким образом, каждые из
10 следующего могут независимо быть одинаковыми или различными в двух полипептидах: N-концевая область; первый линкер; второй линкер; первый LBD; второй LBD и мультимеризующий домен. Возможны многие комбинации, при условии, что обеспечивается требуемая специфичность подавления в отношении изоформы.

[0042] В некоторых вариантах осуществления средства, связывающего TGF β , первая полипептидная конструкция и вторая полипептидная конструкция содержат последовательность, изложенную под SEQ ID NO:95, или последовательность, на по
20 меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоят из нее. В некоторых вариантах осуществления средства, связывающего TGF β , первая полипептидная конструкция и вторая полипептидная конструкция содержат последовательность, изложенную под SEQ ID NO:95, или состоят из
25 нее.

[0043] В некоторых вариантах осуществления средства, связывающего TGF β , разные TGF β -связывающие области содержат аминокислотную последовательность, изложенную
30 под SEQ ID NO:95, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоят из нее.

[0044] В некоторых вариантах осуществления средства, связывающего TGF β , средство, связывающее TGF β , содержит

первую полипептидную конструкцию, содержащую от N-конца к С-концу: (i) аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:40, и (ii) первую Fc-область IgG1 человека, и

5 вторую полипептидную конструкцию, содержащую от N-конца к С-концу: (i) аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:40, и (ii) вторую Fc-область IgG1 человека,

где первая полипептидная конструкция и вторая полипептидная конструкция связаны вместе посредством первой и второй Fc-области IgG1 человека.

[0045] В некоторых вариантах осуществления эффективность подавления средства, связывающего TGF β , в отношении как активности изоформы TGF β 1, так и активности изоформы TGF β 3 больше, чем в отношении активности изоформы TGF β 2, и где относительная эффективность подавления средства, связывающего TGF β , в отношении активности изоформы TGF β 3 по сравнению с активностью изоформы TGF β 1 (соотношение IC₅₀ TGF β 3 TGF β 1) составляет приблизительно 2,5:1 или меньше.

15 **[0046]** В некоторых вариантах осуществления средство, связывающее TGF β , предусмотренное в данном документе, представляет собой гомодимер полипептидной конструкции, предусмотренной в данном документе.

[0047] В альтернативных вариантах осуществления средство, связывающее TGF β , является гомодимерным, то есть первый и второй полипептиды являются одинаковыми или
20 практически одинаковыми.

[0048] В некоторых вариантах осуществления полипептид или средство, связывающее TGF β , может быть конъюгированным с нацеливающим средством, терапевтическим фрагментом, выявляемым фрагментом и/или диагностическим фрагментом.

[0049] В другом широком аспекте предусмотрены нуклеиновые кислоты, кодирующие
25 полипептиды и средства, связывающие TGF β , разработанные по технологии по настоящему изобретению. Также предусмотрены векторы и плазмиды, содержащие такие нуклеиновые кислоты, и/или для экспрессии полипептидов и средств, связывающих TGF β . Например, в одном варианте осуществления предусмотрена нуклеиновая кислота, характеризующаяся последовательностью, изложенной под любым из SEQ ID NO: 106-109, а также векторы и
30 плазмиды, содержащие эти нуклеиновые кислоты. В другом варианте осуществления предусмотрена нуклеиновая кислота, характеризующаяся по меньшей мере 80% идентичностью последовательности, по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, по меньшей мере 98%

идентичностью последовательности или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 106-109, или способная к гибридизации с ней в условиях высокой жесткости. Также предусмотрены клетки, экспрессирующие полипептиды и средства, связывающие TGF β , разработанные по технологии по настоящему изобретению.

5 **[0050]** В дополнительных аспектах предусмотрены способы изготовления полипептидов и средств, связывающих TGF β , разработанных по технологии по настоящему изобретению, включающие осуществление экспрессии одного или нескольких полипептидов, предусмотренных в данном документе, в клетке с последующими их выделением и/или очисткой. В некоторых вариантах осуществления полипептидные конструкции и средства, связывающие TGF β , экспрессируются в форме, которая секретируется клеткой, например, с применением сигнального пептида на N-конце, что позволяет извлечь полипептид или средство, связывающее TGF β , из культуральной среды.

[0051] В другом широком аспекте предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие полипептидную конструкцию или средство, связывающее TGF β , в соответствии с настоящим изобретением, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составляют для введения путем инъекции или инфузии, например, для внутривенного, подкожного, интраперитонеального или внутримышечного введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции

15

20 **[0052]** В еще одном широком аспекте предусмотрены способы предупреждения или лечения TGF β -ассоциированного заболевания или состояния, при этом способы включают введение терапевтически эффективного количества полипептида, средства, связывающего TGF β , или фармацевтической композиции, разработанных по технологии по настоящему изобретению, субъекту, с предупреждением или лечением таким образом TGF β -ассоциированного заболевания или состояния.

[0053] Примеры TGF β -ассоциированных заболеваний или состояний, которые можно предупреждать или лечить в соответствии с настоящим изобретением, включают, например и без ограничения, фиброз (например, фиброзное заболевание, фиброзное рубцевание, фибропролиферативные нарушения); рак (например, злокачественные новообразования, солидные опухоли, метастазирование) и виды недостаточности костного мозга (например, синдром Швахмана-Бодиана-Даймонда, анемию Фанкони). В некоторых вариантах осуществления полипептид или средство, связывающее TGF β , описанные в данном документе, используют для лечения или предупреждения фиброза, включая, например и без

25

30

ограничения, фиброзное заболевание тканей и/или органов и фиброзное рубцевание, например, легочный фиброз (например, идиопатический легочный фиброз), почечный фиброз, фиброз печени (например, цирроз печени), системный склероз, склеродермию, фиброз кожи, фиброз сердца, миелофиброз и т. п.

5 **[0054]** В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы предупреждения или лечения заболевания или состояния, опосредованного TGFβ1 и/или TGFβ3, при этом способы включают введение терапевтически эффективного количества полипептида, средства, связывающего TGFβ, или фармацевтической композиции, разработанных по
10 технологии по настоящему изобретению, субъекту, с лечением таким образом заболевания или состояния, опосредованного TGFβ1 и/или TGFβ3. В одном варианте осуществления предусмотрен способ предупреждения или лечения заболевания или состояния, опосредованного TGFβ3, у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества полипептида, средства, связывающего TGFβ, или фармацевтической композиции, разработанных по технологии по настоящему
15 изобретению, субъекту, с предупреждением или лечением таким образом заболевания или состояния, опосредованного TGFβ3.

[0055] В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы предупреждения или лечения фиброза у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества полипептида, средства, связывающего TGFβ, или
20 фармацевтической композиции, разработанных по технологии по настоящему изобретению, субъекту, с предупреждением или лечением таким образом фиброза.

[0056] В дополнительном широком аспекте предусмотрены наборы и упаковки для лечения TGFβ-ассоциированного заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, содержащие полипептид, средство, связывающее TGFβ, или фармацевтическую
25 композицию в соответствии с настоящим изобретением; необязательно один или несколько дополнительных компонентов, таких как кислоты, основания, буферные средства, неорганические соли, растворители, антиоксиданты, консерванты или хелаторы металлов и/или инструменты для их введения, такие как шприцы, иглы и т. п. Также могут быть включены инструкции по введению или применению.

30 **[0057]** В еще одном аспекте в данном документе предусмотрены способы изготовления полипептидной конструкции или средства, связывающего TGFβ, предусмотренных в данном документе, включающие культивирование клетки-хозяина, предусмотренной в данном документе, в условиях, подходящих для экспрессии белка, и сбор полипептидной конструкции или средства, связывающего TGFβ.

[0058] В еще одном аспекте в данном документе предусмотрены полипептидные конструкции или средства, связывающие TGF β , получаемые посредством способов изготовления, предусмотренных в данном документе.

[0059] Дополнительный объем, применимость и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из неограничивающего подробного описания, приведенного в данном документе далее. Однако следует понимать, что данное подробное описание, несмотря на то, что оно указывает на иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения, приведено исключительно в качестве примера со ссылкой на прилагаемые графические материалы.

10 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0060] Файл патента или заявки содержит по меньшей мере одну фигуру, выполненную в цвете. Копии данного патента или патентной заявки с цветной(цветными) фигурой(фигурами) будут предоставлены ведомством по запросу и при уплате необходимой пошлины.

[0061] Для лучшего понимания технологии и более наглядного представления того, как она может быть реализована, в качестве примера будет приведена ссылка на прилагаемые графические материалы, которые иллюстрируют аспекты и признаки в соответствии с неограничивающими вариантами осуществления технологии по настоящему изобретению.

[0062] На **фиг. 1** показана схематическая структура доменной организации тетравалентных средств, связывающих TGF β , в соответствии с определенными вариантами осуществления. Показанный на данной фигуре вариант осуществления представляет собой гомодимер первого полипептида (левая сторона) и второго полипептида (правая сторона), соединенных дисульфидным мостиком в мультимеризующем домене (показан двумя линиями). Лиганд-связывающие домены (LBD) показаны кругами, мультимеризующие домены показаны овалами, а N-концевые области и линкеры показаны прямоугольниками. В вариантах осуществления, где связывающее средство является гетеродимером, первый и второй полипептиды отличаются одной или несколькими областями или частями (не показано).

[0063] На **фиг. 2A** показано перекрывание мономерных структур TGF β 1 (синий) и TGF β 3 (зеленый).

[0064] На **фиг. 2B** показано перекрывание димера TGF β 1 (синий) и димера TGF β 3 (зеленый). Соответствующие мономеры на этом участке совмещены, чтобы показать разницу между мономерами при отображении димера под определенным углом.

[0065] На **фиг. 2C** показана иллюстративная модель T22d35-Fc-IgG1-v1(CC) (SEQ ID NO:

6), связанного с лигандом TGF β , демонстрирующая второй домен, связывающий лиганд, второй линкер и области мультимеризующего домена (Fc).

[0066] На фиг. 3A показан анализ иллюстративных средств, связывающих TGF β , посредством электрофореза в полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях.

5 После экспрессии и очистки загружали 2 мкг каждого белка в гель, как указано: Ctl: контроль; p61: белок 61; p96: белок 96; p101: белок 101; p107: белок 107; p112: белок 112.

[0067] На фиг. 3B показан анализ иллюстративных средств, связывающих TGF β , посредством электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях.

10 После экспрессии и очистки загружали 2 мкг каждого белка в гель, как указано: Ctl: контроль; p61: белок 61; p96: белок 96; p101: белок 101; p107: белок 107; p112: белок 112.

[0068] На фиг. 4A показаны иллюстративные результаты клеточного анализа A549/IL-11 по подавлению TGF β 1 для белков 61, 96, 101, 107 и 112 и контроля, как указано. В таблице перечислены рассчитанные значения IC₅₀, рассчитанные в Graphpad Prism. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего значения (SEM).

15 **[0069] На фиг. 4B** показаны иллюстративные результаты клеточного анализа A549/IL-11 по подавлению TGF β 3 для белков 61, 96, 101, 107 и 112 и контроля, как указано. В таблице перечислены рассчитанные значения IC₅₀, рассчитанные в Graphpad Prism. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего значения (SEM).

20 **[0070] На фиг. 5A** показан анализ посредством электрофореза в полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях следующих иллюстративных средств, связывающих TGF β : p112, p111, p108, p105, p104, p101, p99 и p71. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего значения (SEM).

25 **[0071] На фиг. 5B** показан анализ посредством электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях следующих иллюстративных средств, связывающих TGF β : p112, p111, p108, p105, p104, p101, p99 и p71. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего значения (SEM).

30 **[0072] На фиг. 6A** показаны иллюстративные результаты клеточного анализа A549/IL-11 по подавлению TGF β 1 для белков 113, 115 и 116 и контроля, как указано. В таблице перечислены рассчитанные значения IC₅₀, рассчитанные в Graphpad Prism. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего значения (SEM).

[0073] На фиг. 6B показаны иллюстративные результаты клеточного анализа A549/IL-11 по подавлению TGF β 3 для белков 113, 115 и 116 и контроля, как указано. В таблице перечислены рассчитанные значения IC₅₀, рассчитанные в Graphpad Prism. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего значения (SEM).

[0074] На **фиг. 7А** показаны иллюстративные результаты клеточного анализа A549/IL-11 по подавлению TGF β 1 для белков 101, 129 и 130 и контроля, как указано. В таблице перечислены рассчитанные значения IC₅₀, рассчитанные в Graphpad Prism. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего значения (SEM).

5 [0075] На **фиг. 7В** показаны иллюстративные результаты клеточного анализа A549/IL-11 по подавлению TGF β 3 для белков 101, 129 и 130 и контроля, как указано. В таблице перечислены рассчитанные значения IC₅₀, рассчитанные в Graphpad Prism. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего значения (SEM).

10 [0076] На **фиг. 8А** показаны иллюстративные результаты клеточного анализа A549/IL-11 по подавлению TGF β 1 для белков 101, 131, 132 и 133 и контроля, как указано. В таблице перечислены рассчитанные значения IC₅₀, рассчитанные в Graphpad Prism. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего значения (SEM).

15 [0077] На **фиг. 8В** показаны иллюстративные результаты клеточного анализа A549/IL-11 по подавлению TGF β 3 для белков 101, 131, 132 и 133 и контроля, как указано. В таблице перечислены рассчитанные значения IC₅₀, рассчитанные в Graphpad Prism. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего значения (SEM).

20 [0078] На **фиг. 9А** показаны иллюстративные результаты клеточного анализа A549/IL-11 по подавлению TGF β 1 для белков 96, 134 и 135 и контроля, как указано. В таблице перечислены рассчитанные значения IC₅₀, рассчитанные в Graphpad Prism. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего значения (SEM).

[0079] На **фиг. 9В** показаны иллюстративные результаты клеточного анализа A549/IL-11 по подавлению TGF β 3 для белков 96, 134 и 135 и контроля, как указано. В таблице перечислены рассчитанные значения IC₅₀, рассчитанные в Graphpad Prism. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего значения (SEM).

25 [0080] На **фиг. 10А** показаны иллюстративные результаты клеточного анализа A549/IL-11 по подавлению TGF β 1 для белков 101 и 128 и контроля, как указано. В таблице перечислены рассчитанные значения IC₅₀, рассчитанные в Graphpad Prism. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего значения (SEM).

30 [0081] На **фиг. 10В** показаны иллюстративные результаты клеточного анализа A549/IL-11 по подавлению TGF β 3 для белков 101 и 128 и контроля, как указано. В таблице перечислены рассчитанные значения IC₅₀, рассчитанные в Graphpad Prism. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего значения (SEM).

[0082] На **фиг. 11** показаны иллюстративные результаты клеточного анализа A549/IL-11 по подавлению TGF β 2 для белков 61, 96 и 101 и контроля, как указано. В таблице перечислены

рассчитанные значения IC_{50} , рассчитанные в Graphpad Prism. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего значения (SEM).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

5 **[0083]** Технология по настоящему изобретению более подробно описана ниже. Данное описание не является подробным каталогом всех различных путей, которыми может быть реализована технология, или всех признаков, которые могут быть добавлены к технологии по настоящему изобретению. Например, признаки, проиллюстрированные в отношении
10 одного варианта осуществления, могут быть включены в другие варианты осуществления, и признаки, проиллюстрированные в отношении конкретного варианта осуществления, могут быть удалены из этого варианта осуществления. Кроме того, многочисленные вариации и дополнения к различным вариантам осуществления, предложенным в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники в свете настоящего раскрытия, при этом вариации и дополнения не выходят за пределы технологии по
15 настоящему изобретению. Следовательно, следующее описание предназначено для иллюстрации некоторых конкретных вариантов осуществления технологии, а не для исчерпывающего описания всех их изменений, комбинаций и вариаций.

Определения

[0084] Чтобы обеспечить ясное и последовательное понимание терминов, используемых в
20 настоящем описании, ниже представлен ряд определений. Более того, если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист в той области, к которой относится настоящее изобретение.

[0085] Применение терминов в единственном числе в сочетании с термином
25 "включающий" в формуле изобретения и/или описании может означать "один", но это также соответствует значению "один или несколько", "по меньшей мере один" и "один или более чем один". Сходным образом, термин "другой" может означать по меньшей мере второй или более. Эти термины должны толковаться как в единственном, так и во множественном числе, если иное не указано в данном документе или явно не противоречит
30 контексту.

[0086] Используемые в данном документе термины "включающий" (и любая форма "включающего", такая как "включают" и "включает"), "характеризующийся" (и любая форма "характеризующегося", такая как "характеризуются" и "характеризуется"), "предусматривающий" (и любая форма "предусматривающего", такая как

"предусматривают" и "предусматривает") или "содержащий" (и любая форма "содержащего", такая как "содержат" и "содержит") являются включающими или открытыми и не исключают дополнительные неуказанные элементы или стадии способа. Термин "состоящий из" следует толковать как закрытый.

- 5 **[0087]** Термин "приблизительно" используют для указания того, что значение или количество относится к фактическому заданному значению, а также к приближению такого заданного значения, которое можно обоснованно предположить на основании обычного уровня техники, включая эквиваленты и приближения, обусловленные экспериментальными условиями и/или условиями измерения для такого заданного
- 10 значения. Например, термин "приблизительно" в контексте заданного значения или диапазона относится к значению или диапазону, которые находятся в пределах 20%, предпочтительно в пределах 15%, более предпочтительно в пределах 10%, более предпочтительно в пределах 9%, более предпочтительно в пределах 8%, более предпочтительно в пределах 7%, более предпочтительно в пределах 6% и более
- 15 предпочтительно в пределах 5% заданного значения или диапазона.

- [0088]** Выражение "и/или", используемое в данном документе, следует понимать как конкретное раскрытие каждого из указанных признаков или компонентов вместе с другим или без другого. Например, "А и/или В" следует понимать как конкретное раскрытие каждого из (i) А, (ii) В и (iii) А и В, как если бы каждый из них был изложен в данном
- 20 документе отдельно. Если специально не указано или не очевидно из контекста, используемый в данном документе термин "или" понимается как включительный и охватывает как "или", так и "и". Например, вариант осуществления "композиции, содержащей А или В", как правило, будет представлять аспект с композицией, содержащей как А, так и В. "Или", однако, должно быть истолковано так, чтобы исключить те
- 25 представленные аспекты, которые не могут быть объединены без противоречия (например, значение рН композиции, которое составляет от 9 до 10 или от 7 до 8).

- [0089]** В данном документе следует понимать, что такие термины, как "от 1 до 20", включают любые индивидуальные значения, находящиеся в пределах от 1 до 20 включительно. Поэтому термин "от 1 до 20" включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,
- 30 14, 15, 16, 17, 18, 19 и/или 20. Такие термины, как "от 1 до 20", также включают любые отдельные поддиапазоны, находящиеся в пределах от 1 до 20 включительно. Поэтому термин "от 1 до 20" также включает такие поддиапазоны как "от 1 до 9", "от 2 до 9", "от 3 до 5", "от 5 до 9", "от 5 до 20", "от 8 до 20" и т. д. То же самое относится к подобным выражениям, таким как без ограничения "от 1 до 19", "от 1 до 18", "от 1 до 10", "от 1 до 9",

"от 5 до 15" и т. д.

[0090] В данном документе следует понимать, что такие термины, как "от приблизительно 15 до приблизительно 35", включают любые индивидуальные значения, находящиеся в пределах от 15 до 35 включительно. Поэтому такие термины, как "от приблизительно 15 до 5 приблизительно 35", включают любое число в пределах от 15 до 35 включительно, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 и/или 35. Такие термины, как "от приблизительно 15 до приблизительно 35", также включают любые отдельные поддиапазоны, находящиеся в пределах от 15 до 35 включительно, "от 10 приблизительно 16 до приблизительно 34", "от приблизительно 16 до приблизительно 24", 10 от приблизительно 24 до приблизительно 34" и т. д. Термин "приблизительно" в контексте количества аминокислот означает, что указанное количество аминокислот конкретно охватывается и допускает вариацию ± 2 в количестве аминокислотных остатков. По сути, такие термины, как "от приблизительно 15 до приблизительно 35", также включают "от 13 до 37", "от 13 до 35", "от 17 до 37", от 17 до 35" и т. д. То же самое относится к подобным 15 выражениям, таким как без ограничения "от приблизительно 16 до приблизительно 34", "от приблизительно 16 до приблизительно 24", от приблизительно 24 до приблизительно 34" и т. д.

[0091] В данном документе следует понимать, что такие термины, как "на по меньшей мере 80% идентичный", включают любые отдельные значения, находящиеся в пределах от 80% 20 до 100% включительно и включающие 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и 100%. Термин "на по меньшей мере 80% идентичный" также включает любые отдельные поддиапазоны, находящиеся в пределах от 80% до 100% включительно, такие как, например, "от 85% до 99%", "от 97% до 100%", "от 90% до 100%" и т. д. То же самое относится к подобным выражениям, таким как 25 без ограничения такие выражения, как "на по меньшей мере 70% идентичный", "на по меньшей мере 90% идентичный" и т. п.

[0092] Используемый в данном документе термин "эффективность подавления" относится к действенности вещества в подавлении конкретной биологической или биохимической функции, такой как без ограничения связывание между белковым рецептором и его 30 лигандом или активация клеточного рецептора его лигандом. В некоторых вариантах осуществления эффективность подавления определяют посредством измерения IC₅₀ ингибитора в отношении конкретного лиганда или субстрата. В этом случае относительная эффективность подавления для различных ингибиторов и/или лигандов может быть оценена посредством сравнения значений IC₅₀. Например, относительная эффективность

подавления 3:1 означает, что соотношение значений IC_{50} составляет 3:1. Термины "эффективность подавления", "эффективность ингибирования", "действенность подавления" и "эффективность нейтрализации" используют в данном документе взаимозаменяемо.

5 **[0093]** Используемый в данном документе термин " IC_{50} " относится к половине максимальной подавляющей концентрации (т. е. концентрации вещества, которая необходима для 50% подавления *in vitro*). Это мера эффективности или действенности вещества в подавлении конкретной биологической или биохимической функции. Значения IC_{50} обычно выражают в виде молярной концентрации. IC_{50} ингибитора может быть
10 определена посредством построения кривой доза-ответ и изучения влияния различных концентраций ингибитора на конкретную рассматриваемую биологическую или биохимическую функцию.

[0094] Используемый в данном документе термин "авидность" относится к общей силе связывающих взаимодействий между белковым рецептором и его лигандом. Авидность
15 обычно относится к накопленной силе множественных, индивидуальных нековалентных связывающих взаимодействий, например, между белковым рецептором и его лигандом, и отличается от "аффинности", которая описывает силу одного связывающего взаимодействия. Следует понимать, что авидность редко является простой суммой составляющих ее аффинностей, поскольку многие факторы (такие как локальная
20 концентрация или близость, мультимеризация, 3D-структура или конформация и т. п.) могут влиять на биомолекулярные взаимодействия.

[0095] Используемый в данном документе термин "функционально эквивалентный" относится к вариантным последовательностям, которые характеризуются такой же или практически такой же биологической активностью или функцией, как и исходная
25 последовательность, из которой они получены, например, без существенного изменения физиологических, химических, физико-химических или функциональных свойств по сравнению с исходной последовательностью. Термин "практически идентичный" относится к последовательностям, которые функционально эквивалентны исходной или эталонной последовательности и характеризуются высокой степенью идентичности
30 последовательности с ней. Как правило, практически идентичная последовательность на по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентична исходной или

эталонной последовательности и характеризуется той же функцией. В некоторых случаях, когда речь идет о последовательностях нуклеиновой кислоты, практически идентичная последовательность гибридизуется с исходной последовательностью в условиях высокой жесткости, например, в солевых и температурных условиях, практически эквивалентных от 0,5 X SSC до приблизительно 5 X SSC и 65°C, как для гибридизации, так и для промывки. Как правило, охватываются вариантные последовательности, которые практически идентичны или функционально эквивалентны последовательностям, предусмотренным в соответствии с настоящим изобретением.

[0096] Используемый в данном документе термин "мультимеризующий домен" относится к аминокислотной последовательности, которая обеспечивает сборку полипептидных цепей в мультимер. Термин "мультимер" относится к молекуле, полученной из нескольких мономеров. Термин "мультимер" охватывает без ограничения димеры, тримеры, 4-меры, 5-меры, 6-меры, 8-меры, 10-меры и т. д.

[0097] Термин "димерный" относится к наличию двух полипептидов, описанных в данном документе, в средстве, связывающем TGFβ. "Гомодимерный" означает, что два полипептида характеризуются одинаковой последовательностью, тогда как "гетеродимерный" означает, что два полипептида характеризуются разными последовательностями.

[0098] Термин "дуплет" относится к наличию в полипептиде двух копий домена TGFβR, связывающего лиганд (LBD), соединенных вместе в тандем.

[0099] Термин "тетравалентный" относится к наличию четырех копий домена TGFβR, связывающего лиганд (LBD), в средстве, связывающем TGFβ.

Полипептиды и средства, связывающие TGFβ

[0100] В данном документе предусмотрены новые полипептидные конструкции, содержащие область, связывающую TGFβ, и мультимеризующий домен, и средства, связывающие TGFβ, содержащие две такие полипептидные конструкции, собранные посредством мультимеризующего домена. Область, связывающая TGFβ, содержит два TGFβRII-LBD, соединенных в тандем посредством первого линкера, и соединена с мультимеризующим доменом посредством второго линкера. Полипептидные конструкции и средства, связывающие TGFβ, по настоящему изобретению оптимизированы посредством улучшения их ассоциации с TGFβ. В частности, линкеры выбирают для оптимизации специфичности в отношении изоформы TGFβ таким образом, что соотношение IC₅₀ TGFβ3:TGFβ1 составляет не более чем приблизительно 2,5:1 (что указывает на сходную эффективность подавления в отношении обеих изоформ), без повышения нежелательного

подавления TGFβ2 и без значительного снижения общей эффективности (например, IC₅₀ остается в пиколярном диапазоне).

[0101] В иллюстративных вариантах осуществления полипептидные конструкции и средства, связывающие TGFβ, по настоящему изобретению содержат две полипептидные цепи, которые ассоциированы посредством Fc-области антитела или посредством константного домена CH2, константного домена CH3 и/или посредством комбинации CH2 и CH3. Константная область антитела может происходить из антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека или практически идентичного ему. Ассоциация обеих полипептидных цепей обычно происходит в ходе экспрессии и секреции белка, например, в клетках млекопитающих. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления средства, связывающие TGFβ, могут предусматривать гомодимеры, т. е. димеры полипептидной конструкции, характеризующиеся последовательностью, изложенной под любым из SEQ ID NO: 81-103 и 105, или последовательностью, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной ей. В других вариантах осуществления средства, связывающие TGFβ, предусматривают гетеродимеры, т. е. димеры двух разных полипептидных конструкций, по меньшей мере одной из полипептидных конструкций, характеризующейся последовательностью, изложенной под любым из SEQ ID NO: 81-103 и 105, или последовательностью, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной ей.

[0102] В целом, полипептидные конструкции и средства, связывающие TGFβ, организованы таким образом, что мультимеризующий домен связан на своем N-конце с C-концом TGFβ-связывающей области таким образом, что для каждого полипептида ориентация конструкции от N-конца к C-концу представляет собой одну цепь (N-концевая область)-(первый TGFβR-LBD)-(первый линкер)-(второй TGFβR-LBD)-(второй линкер)-мультимеризующий домен.

[0103] В иллюстративном варианте осуществления мультимеризующий домен обеспечивает сборку двух или более полипептидных цепей ковалентным образом, например, посредством дисульфидной связи между остатками цистеина. В качестве альтернативы, мультимеризующий домен может обеспечить сборку полипептидных цепей нековалентным образом, таким как, например и без ограничения, по спираль-спиральной структуре (De Crescenzo, G. et al., 2004).

[0104] В одном варианте осуществления мультимеризующий домен представляет собой димеризующий домен, т.е. обеспечивает сборку двух полипептидных цепей с образованием димера. В соответствии с настоящим изобретением такие димеры обычно содержат два полипептида, при этом каждый полипептид содержит два TGF β R-LBD, связанных вместе и связанных с димеризующим доменом, как описано в данном документе, с образованием таким образом тетравалентного средства, связывающего TGF β . Охватываются гомодимеры и гетеродимеры полипептидных конструкций, предусмотренных в данном документе.

[0105] В некоторых вариантах осуществления мультимеризующий или димеризующий домен полипептида содержит константные области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая, например, домен CH2 и/или CH3. Обычно используют Fc-часть иммуноглобулина. Однако было обнаружено, что для димеризации также подходит спираль-спиральная структура. Иллюстративные варианты осуществления Fc-частей включают, например и без ограничения, Fc-части, которые потеряли способность взаимодействовать с конкретным Fc-рецептором. В дополнительных вариантах осуществления мультимеризующий домен может предусматривать IgG-подобный димеризующий домен, например, димеризующий домен IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления мультимеризующий домен может обеспечивать одну или несколько эффекторных функций, таких как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), активация комплемента (комплементзависимая цитотоксичность, CDC) или опсонизация.

[0106] В некоторых вариантах осуществления мультимеризующий или димеризующий домен содержит CH2, CH3 или CH2 и CH3 из тяжелой цепи антитела человеческого происхождения. Например и без ограничения, тяжелая цепь антитела может быть выбрана из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В вариантах осуществления константный домен в конструкциях представляет собой CH2 *per se*, или CH3 *per se*, или CH2-CH3. Компонент тяжелой цепи антитела обычно обеспечивает дисульфидное сшивание между одноцепочечными полипептидными конструкциями, которые являются одинаковыми или разными. В одном варианте осуществления мультимеризующий домен обеспечивает по меньшей мере одну дисульфидную связь между одноцепочечными полипептидными конструкциями. В другом варианте осуществления мультимеризующий домен обеспечивает по меньшей мере две дисульфидные связи между одноцепочечными полипептидными конструкциями. В некоторых случаях тяжелая цепь антитела также

обеспечивает выделение димерного полипептида с применением белка А, например, после продуцирования в клетках-хозяевах.

[0107] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мультимеризующий или димеризующий домен представляет собой константный домен антитела, который обеспечивает сшивание между двумя полипептидными конструкциями по настоящему изобретению. Это достигается, когда, например, экспрессируемые полипептидные конструкции секретируются из экспрессирующего их хозяина. Таким образом, получение одноцепочечного полипептида может обеспечить конструкцию в димерной форме, в которой две полипептидные цепи сшиты посредством дисульфидных мостиков, которые включают один или несколько остатков цистеина в пределах каждого из константных доменов антитела, присутствующих в каждом из полипептидов. В некоторых вариантах осуществления мультимеризующий домен (например, константная область) не характеризуется определенной активностью, за исключением того, что он действует в качестве структуры, посредством которой могут образовываться мультимеры (например, димеры). Такие минимальные константные области также могут быть изменены для обеспечения определенного преимущества посредством включения соответствующих шарнирных областей и необязательно изменения состава остатков цистеина. Например, некоторые или все остатки цистеина, участвующие в образовании мостика между двумя Fc-фрагментами или естественным образом используемые для образования мостика между тяжелой и легкой цепями полноразмерного антитела, могут быть заменены или удалены. Одним из преимуществ минимизации количества остатков цистеина является снижение склонности к скремблированию дисульфидных связей, что может способствовать агрегации. Следует отметить, что не все встречающиеся в природе межшарнирные дисульфидные связи должны быть образованы для того, чтобы произошла димеризация Fc, при этом следует отметить, что стабильность димера Fc может зависеть от количества межмолекулярных дисульфидных мостиков.

[0108] Используемые в данном документе термины "антитело" и "иммуноглобулин (Ig)" используются взаимозаменяемо для обозначения белка, сконструированного из спаренных тяжелых и легких полипептидных цепей. Структуры антитела и каждого из доменов хорошо изучены и знакомы специалистам в данной области техники, и в данном документе приводится лишь краткое их описание. Когда антитело правильно свернуто, каждая цепь сворачивается в ряд отдельных глобулярных доменов, соединенных более линейными полипептидными последовательностями. В частности, легкая цепь Ig сворачивается в переменный (VL) и константный (CL) домены, тогда как тяжелая цепь сворачивается в

вариабельный (VH) и три константных (CH1, CH2, CH3) домена. После спаривания взаимодействие вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей (VH и VL) и первого константного домена (CL и CH1) приводит к образованию Fab (антигенсвязывающего фрагмента), содержащего связывающую область (Fv); взаимодействие двух тяжелых цепей приводит к спариванию доменов CH2 и CH3, что приводит к образованию Fc (кристаллизуемого фрагмента). Характеристики, описанные в данном документе для доменов CH2 и CH3, также применимы к Fc.

[0109] В определенных вариантах осуществления и аспектах настоящего изобретения мультимеризующий или димеризующий домен может характеризоваться по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичностью последовательности с константной областью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или с доменом CH2 и/или CH3. IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 могут быть получены из организма человека. В конкретном варианте осуществления средства, связывающие TGF β , описанные в данном документе, предусматривают средства, содержащие димеризующий домен IgG1. В другом варианте осуществления средства, связывающие TGF β , описанные в данном документе, предусматривают средства, содержащие димеризующий домен IgG4.

[0110] Мультимеризующий или димеризующий домен может быть сконструирован для снижения агрегации или для модуляции стабильности средства, связывающего TGF β , образованного посредством сборки более чем одного полипептида, раскрытого в данном документе. Поэтому настоящее изобретение охватывает Fc-части, содержащие мутацию(мутации), например, в шарнирной области. Иллюстративные варианты осуществления вариантов Fc и модифицированных шарнирных областей представлены, например, в патентных заявках, опубликованных под №№ WO2018/158727 и WO2017/037634. Следует понимать, что при упоминании шарнирной части мультимеризующего или димеризующего домена шарнир является частью мультимеризующего домена и не считается частью второго линкера.

[0111] В иллюстративных вариантах осуществления мультимеризующие или димеризующие домены характеризуются последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 49-80, или ее функционально эквивалентным вариантом, или последовательностью, на по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей

мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичной ей. В конкретном варианте осуществления мультимеризующий домен может содержать SEQ ID NO: 49 или последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичную ей. В другом варианте осуществления мультимеризующий домен может содержать SEQ ID NO: 50 или последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичную ей.

[0112] В соответствии с настоящим изобретением первый мультимеризующий или димеризующий домен и второй мультимеризующий или димеризующий домен средства, связывающего TGF β , могут характеризоваться одинаковой или практически одинаковой аминокислотной последовательностью в определенных вариантах осуществления. В качестве альтернативы, в некоторых вариантах осуществления мультимеризующий или димеризующий домен может отличаться, при условии, что на мультимеризацию не оказывается негативного влияния.

[0113] Следует понимать, что мультимеризующий домен не предназначен для конкретного ограничения. Можно использовать любую аминокислотную последовательность, которая обеспечивает ассоциацию полипептидных цепей с образованием тетравалентного средства, связывающего TGF β , в соответствии с настоящим изобретением, при условии сохранения требуемой функции и специфичности в отношении изоформы.

[0114] В соответствии с настоящим изобретением линкеры в полипептидных конструкциях и средствах, связывающих TGF β , могут предусматривать линкер на основе IDR, вариант линкера на основе IDR, гибридный линкер, вариант гибридного линкера, усеченный линкер, вариант усеченного линкера или удлиненный линкер, как раскрыто в данном документе, или состоять из них.

[0115] Эктодомен TGF β RII человека (TGF β RII-ECD; SEQ ID NO: 1) содержит структурированный лиганд-связывающий домен из 102 аминокислот (SEQ ID NO: 2; также упоминаемый в данном документе как "TGF β R-LBD"), который фланкирован двумя внутренне неупорядоченными областями: областью из 24 аминокислот на N-конце (SEQ ID NO: 3) и областью из 10 аминокислот на C-конце (SEQ ID NO: 4).

[0116] Используемый в данном документе термин "линкер на основе внутренне неупорядоченной области (IDR)" относится к линкеру, содержащему по меньшей мере часть одной или обеих внутренне неупорядоченных областей (IDR), которые фланкируют структурированный лиганд-связывающий домен эктодомена TGF β RII, или состоящему из нее. Линкер на основе IDR обычно обладает значительной идентичностью последовательности с по меньшей мере одной последовательностью внутренне неупорядоченной области эктодомена TGF β RII, и он может обладать значительной идентичностью последовательности как с N-, так и с C-концевой IDR эктодомена TGF β RII или их частями. Следует понимать, что линкер на основе IDR может содержать всю IDR TGF β R, или только ее часть, или несколько частей, связанных вместе.

[0117] В некоторых вариантах осуществления линкер на основе IDR содержит часть одной или обеих IDR (SEQ ID NO: 3 и 4) TGF β RII-ECD человека (SEQ ID NO: 1) или состоит из нее. В вариантах осуществления, в которых включена часть каждой из двух IDR TGF β R, части могут быть соединены вместе либо непосредственно, либо посредством промежуточной линкерной последовательности. Части IDR могут предусматривать всю последовательность IDR или ее варианты (например, замены, усечения).

[0118] В одном варианте осуществления линкер на основе IDR содержит части каждой IDR, непосредственно соединенные вместе, или состоит из них. В определенных вариантах осуществления C-концевая IDR или ее часть непосредственно связана с N-концом N-концевой IDR или ее частью. Неограничивающие примеры таких вариантов осуществления включают, например, линкеры, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 8-16, 19, 22, 23 и 26.

[0119] В одном варианте осуществления линкер на основе IDR содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4, или состоит из нее.

[0120] В одном варианте осуществления линкер на основе IDR не состоит из последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7. В таких вариантах осуществления полипептиды и средства, связывающие TGF β , содержащие последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 7, исключаются из настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления линкеры на основе IDR, которые не обеспечивают требуемую специфичность в отношении изоформы (например, требуемое соотношение IC₅₀ TGF β 3:TGF β 1), исключаются из настоящего изобретения, как и полипептиды и средства, связывающие TGF β , содержащие такие последовательности.

[0121] Варианты линкеров на основе IDR, гибридные линкеры, варианты гибридных линкеров, усеченные линкеры, варианты усеченных линкеров и удлиненные линкеры получают из последовательностей линкеров на основе IDR, раскрытых в данном документе.

[0122] Используемый в данном документе термин "линкер, отличный от линкера на основе

5 IDR" означает линкер, который не имеет существенной гомологии или идентичности с внутренне неупорядоченными областями (IDR), которые фланкируют структурированный лиганд-связывающий домен эктодомена TGF β RII. В аспектах и вариантах осуществления, описанных в данном документе, линкер, отличный от линкера на основе IDR, может представлять собой гибкий линкер, включая, например и без ограничения, глициновые и

10 глицин-сериновые (GS) линкеры. Обычной практикой при получении слитых конструкций является введение искусственных очень гибких глициновых или глицин-сериновых линкеров, таких как GGGGS или [G4S] $_n$ (где n равняется 1, 2, 3, 4 или 5 или больше, например, 10, 25 или 50), между различными областями конструкций. Однако такие искусственные линкеры также могут быть невыгодными вследствие их потенциала к

15 нежелательной иммуногенности и их дополнительной молекулярной массы. Энтропийные факторы также являются потенциальной проблемой в случае глициновых линкеров и GS линкеров, которые являются очень гибкими и могут стать частично ограниченными при связывании мишени, вызывая потерю энтропии, что неблагоприятно для связывания. Поэтому в некоторых вариантах осуществления полипептиды и средства, связывающие

20 TGF β , по настоящему изобретению не содержат линкер, отличный от линкера на основе IDR, или содержат по меньшей мере один линкер на основе IDR или вариант линкера на основе IDR в дополнение к линкеру, отличному от линкера на основе IDR. Неограничивающие примеры линкеров, отличных от линкеров на основе IDR, в соответствии с настоящим изобретением включают SEQ ID NO: 17, 20, 21 и 24.

25 **[0123]** В некоторых вариантах осуществления линкер содержит смесь IDR и GS линкера, такую как, например, аминокислотная последовательность, изложенная под SEQ ID NO: 18 и 25, или состоит из нее. Такие линкеры в данном документе называются гибридными линкерами. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены линкеры, в которых от 3 до 7 или от 3 до 14 аминокислотных остатков в любой из SEQ ID NO: 4, 8-16, 19, 22, 23 и

30 26 заменены на аминокислотную последовательность, содержащую остатки глицина и/или серина (глициновый линкер или GS линкер). Эти линкеры в данном документе называются гибридными линкерами. Также охватываются варианты гибридных линкеров; это функционально эквивалентные варианты гибридных линкеров, которые предусматривают

одну или несколько вставок, делеций или аминокислотных замен, необязательно консервативную аминокислотную замену. Варианты дополнительно обсуждаются ниже.

[0124] В иллюстративных вариантах осуществления гибридных линкеров и вариантов гибридных линкеров по меньшей мере 3 последовательные аминокислоты линкеров на основе IDR или вариантов линкеров на основе IDR заменены на остатки глицина и/или серина. В дополнительных иллюстративных вариантах осуществления гибридных линкеров или вариантов гибридных линкеров по меньшей мере 7 последовательных аминокислот линкеров на основе IDR или вариантов линкеров на основе IDR заменены на остатки глицина и/или серина. В еще одних дополнительных иллюстративных вариантах осуществления гибридных линкеров или вариантов гибридных линкеров два набора из от 3 до 7 последовательных аминокислот линкеров на основе IDR или вариантов линкеров на основе IDR заменены остатками глицина и/или серина. Два набора из от 3 до 7 последовательных аминокислот могут находиться в разных местах в пределах линкерной последовательности или могут располагаться последовательно.

[0125] Примеры глициновых и GS последовательностей для применения в гибридных линкерах и вариантах гибридных линкеров включают без ограничения GSG и любую из SEQ ID NO: 17, 18, 20, 21, 24 и 25.

[0126] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой усеченный линкер или вариант усеченного линкера. Такие линкеры предусматривают усечение (делецию), например, на от 1 до приблизительно 20 последовательных аминокислот (и любой диапазон в пределах от 1 до приблизительно 20, например, от 1 до приблизительно 10, от 1 до приблизительно 5 и т. д.) либо на одном N- или C-конце, либо на обоих N- и C-концах линкера на основе IDR, предусмотренного в данном документе. В иллюстративном варианте осуществления аминокислотное усечение может находиться на N-конце любой из SEQ ID NO: 3 или 8-26. В иллюстративном варианте осуществления усечение может привести к удалению 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 остатков на N-конце. В другом иллюстративном варианте осуществления усечение может находиться на C-конце любой из SEQ ID NO: 4 и 8-26. В иллюстративном варианте осуществления усечение может привести к удалению 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 остатков на C-конце. В другом варианте осуществления усечение может привести к удалению 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 остатков на C-конце.

[0127] В другом варианте осуществления усечение может представлять собой внутреннюю делецию, такую как, например, делеция, начинающаяся с аминокислоты номер 10 или 11 из SEQ ID NO: 7. В одном варианте осуществления делетированы 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,

12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 остатков из SEQ ID NO: 7, включая аминокислоту номер 10 и/или 11. В других вариантах осуществления делетированы 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 остатков внутри любой из SEQ ID NO: 4 и 8-26.

[0128] В иллюстративном варианте осуществления аминокислотное усечение может привести к удалению от 1 до 10 аминокислот, охватывающих область, определяемую аминокислотными остатками под номерами 11-20 из любой из SEQ ID NO: 7-26.

[0129] Другие иллюстративные и неограничивающие варианты осуществления усеченных линкеров предусмотрены под SEQ ID NO: 8-16, 18, 19, 22, 23 и 26.

[0130] В настоящем изобретении также предусмотрены варианты усеченных линкеров.

Такие варианты усеченных линкеров могут содержать аминокислотную замену (консервативную или неконсервативную) по сравнению с усеченными линкерами, раскрытыми в данном документе.

[0131] В некоторых вариантах осуществления первый линкер содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся (а) делецией по меньшей мере одного N-концевого аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 8; (b) делецией по меньшей мере одного C-концевого аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 8; (c) делецией по меньшей мере одного внутреннего аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 8, или (d) одной или несколькими заменами в аминокислотной последовательности по сравнению с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 8 или любой из (a) – (c), или состоит из нее. В одном варианте его осуществления делеция аминокислот представляет собой делецию 16 аминокислот из SEQ ID NO: 3.

[0132] В некоторых вариантах осуществления второй линкер содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся (а) делецией по меньшей мере одного N-концевого аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11; (b) делецией по меньшей мере одного C-концевого аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11; (c) делецией по меньшей мере одного внутреннего аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11, или (d) одной или несколькими заменами в аминокислотной последовательности по сравнению с SEQ ID NO: 4, 7, 9 или 11 или любой из (a) – (c), или состоит из нее.

[0133] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой удлиненный линкер. Такие линкеры характеризуются добавлением (удлинением) от 1 до 10 аминокислот

(и любого диапазона в пределах от 1 до 10, такого как, например, от 1 до 7, от 1 до 5, от 1 до 3, 1, 2, 3 и т. д.) либо на одном N- или C-конце, либо на обоих N- и C-концах любого из линкера на основе IDR, варианта линкера на основе IDR, гибридного линкера, варианта гибридного линкера, усеченного линкера или варианта усеченного линкера, как раскрыто в
5 данном документе. Каждая из этих дополнительных аминокислот может быть независимо выбрана из любого аминокислотного остатка.

[0134] В иллюстративном варианте осуществления линкеры, раскрытые в данном документе, могут содержать от 1 до 5 дополнительных аминокислотных остатков на своем N-конце. В другом иллюстративном варианте осуществления линкеры, раскрытые в данном
10 документе, могут содержать от 1 до 5 дополнительных аминокислотных остатков на своем C-конце. В дополнительном иллюстративном варианте осуществления линкеры, раскрытые в данном документе, могут содержать от 1 до 5 дополнительных аминокислотных остатков как на их N-конце, так и на C-конце. Такие дополнительные аминокислотные остатки могут быть выбраны из любых аминокислотных остатков и могут быть либо одинаковыми, либо
15 разными. Другие иллюстративные и неограничивающие варианты осуществления удлиненных линкеров охватывают добавление от 1 до 10 аминокислот (и любого диапазона в пределах от 1 до 10, такого как, например, от 1 до 7, от 1 до 5, от 1 до 3, 1, 2, 3 и т. д.) либо на одном N- или C-конце, либо на обоих N- и C-концах любой из SEQ ID NO: 4 и 8-26. Добавленная последовательность может содержать любые аминокислотные остатки.

[0135] Иллюстративные варианты осуществления удлиненных линкеров также включают варианты, содержащие часть линкера, отличного от линкера на основе IDR, либо на их одном N- или C-конце, либо на обоих N- и C-концах. Например, линкер на основе IDR, вариант линкера на основе IDR, гибридный линкер, вариант гибридного линкера, усеченный линкер или вариант усеченного линкера могут быть фланкированы по меньшей
25 мере одним линкером, отличным от линкера на основе IDR, либо на его одном N- или C-конце, либо на обоих N- и C-концах. В качестве альтернативы, линкер, отличный от линкера на основе IDR, может быть фланкирован по меньшей мере линкером на основе IDR, вариантом линкера на основе IDR, гибридным линкером, вариантом гибридного линкера, усеченным линкером или вариантом усеченного линкера либо на его одном N- или C-конце,
30 либо на обоих N- и C-концах.

[0136] В некоторых вариантах осуществления полипептидных конструкций и средств, связывающих TGF β , по настоящему изобретению N-концевая область содержит N-концевую IDR (SEQ ID NO: 3) в TGF β RII-ECD (SEQ ID NO: 1) или последовательность, практически идентичной ей, такую как без ограничения ее усеченный или замененный

вариант, или состоит из нее. Следует понимать, что N-концевая область может быть усечена и/или заменена и иным образом модифицирована, при условии, что требуемые эффективность подавления и специфичность не подвергаются негативному воздействию.

[0137] Настоящее изобретение также охватывает варианты полипептидов и средств, связывающих TGF β , описанных в данном документе. Варианты, охватываемые настоящим изобретением, включают варианты, характеризующиеся вариацией в аминокислотной последовательности любого из элементов (первого и второго лиганд-связывающего домена рецептора TGF β (TGF β R-LBD), первого линкера, второго линкера, N-концевой области, мультимеризующего домена и т. п.) полипептида или средства, связывающего TGF β .

Варианты полипептида или средства, связывающего TGF β , включают, например, варианты, которые характеризуются сходной или улучшенной аффинностью связывания, авидностью, специфичностью в отношении изоформы, эффективностью подавления, стабильностью, технологичностью изготовления и/или сниженной агрегацией по сравнению с полипептидами и средствами, связывающими TGF β , раскрытыми в данном документе.

[0138] Представляющий интерес сайт для замещающего мутагенеза включает мультимеризующий домен полипептида или средства, связывающего TGF β . Иллюстративные варианты осуществления вариантов полипептида или средства, связывающего TGF β , по настоящему изобретению могут предусматривать варианты, содержащие модифицированную константную область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или ее часть. Средства, связывающие TGF β , которые могут содержать константную область IgG1 (модифицированную или немодифицированную), охватываются в данном документе. Средства, связывающие TGF β , которые могут содержать константную область IgG4 (модифицированную или немодифицированную), также охватываются в данном документе.

[0139] Варианты, охватываемые настоящим изобретением, включают варианты, которые могут содержать вставку, делецию или аминокислотную замену (консервативную или неконсервативную). В этих вариантах по меньшей мере один аминокислотный остаток в их аминокислотной последовательности может быть удален, а на его место вставлен другой остаток.

[0140] Как правило, консервативная аминокислотная замена представляет собой замену аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток со сходными химическими свойствами (например, размером, зарядом или полярностью). Консервативные замены можно осуществлять посредством замены аминокислоты из одной из перечисленных ниже групп (группы 1-6) на другую аминокислоту из той же группы.

[0141] Другие иллюстративные варианты осуществления консервативных замен показаны в таблице 1 под заголовком "Предпочтительные замены". Если такие замены приводят к появлению нежелательного свойства, то можно ввести более существенные изменения, обозначенные в таблице 1 как "Иллюстративные замены" или дополнительно описанные ниже со ссылкой на классы аминокислот, и провести скрининг продуктов.

[0142] Из уровня техники известно, что варианты могут быть получены посредством заместительного мутагенеза и могут сохранять биологическую активность (т. е. функциональную эквивалентность) полипептидов по настоящему изобретению. В этих вариантах по меньшей мере один аминокислотный остаток в аминокислотной последовательности удален, а на его место вставлен другой остаток, например, одна или несколько консервативных аминокислотных замен. Примеры замен, обозначенных как "Консервативные замены", показаны в таблице 1. Если такие замены приводят к нежелательному изменению, то вводят другие типы замен, обозначенные как "Иллюстративные замены" в таблице 1 или дополнительно описанные в данном документе со ссылкой на классы аминокислот, и проводят скрининг продуктов.

[0143] Аминокислотные остатки могут быть разделены на группы на основании общих свойств боковой цепи следующим образом:

(группа 1) гидрофобные: норлейцин, метионин (Met), аланин (Ala), валин (Val), лейцин (Leu), изолейцин (Ile);

(группа 2) нейтральные гидрофильные: цистеин (Cys), серин (Ser), треонин (Thr), аспарагин (Asn), глутамин (Gln);

(группа 3) кислотные: аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu);

(группа 4) основные: гистидин (His), лизин (Lys), аргинин (Arg);

(группа 5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: глицин (Gly), пролин (Pro), и

(группа 6) ароматические: триптофан (Trp), тирозин (Tyr), фенилаланин (Phe).

[0144] Неконсервативные замены будут приводить к замене представителя одного из этих классов на другой класс.

Таблица 1. Иллюстративные аминокислотные замены.

Исходный остаток	Иллюстративная замена	Консервативная замена
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys

Исходный остаток	Иллюстративная замена	Консервативная замена
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg, Asp	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg,	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, норлейцин	Leu

[0145] Как правило, степень сходства и идентичности между варьируемыми цепями определяют в данном документе с применением программы для сравнения последовательностей Blast2 (Tatusova, T.A. and Madden, T.L., 1999) с применением настроек по умолчанию, т. е. программы blastp, матрицы BLOSUM62 (штраф за открытие гэпа 11 и штраф за продление гэпа 1; gapx dropoff 50, expect 10,0, размер слова 3) и активированных фильтров.

[0146] Однако уровень идентичности также может быть определен по всей длине данной последовательности. Таким образом, процент идентичности будет указывать на аминокислоты, которые идентичны по сравнению с исходным пептидом и которые могут занимать одинаковое или сходное положение. Процент сходства будет указывать на аминокислоты, которые являются идентичными, и аминокислоты, которые заменены

посредством консервативной аминокислотной замены по сравнению с исходным пептидом в том же или сходном положении.

[0147] В некоторых вариантах осуществления варианты по настоящему изобретению, таким образом, содержат аминокислотные последовательности, которые характеризуются по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с исходной последовательностью или частью исходной последовательности.

[0148] В некоторых вариантах осуществления изменение в аминокислотной последовательности происходит в лиганд-связывающем домене рецептора TGF β (TGF β R-LBD) из полипептида или средства, связывающего TGF β . В других вариантах осуществления изменение может происходить вне лиганд-связывающего домена рецептора TGF β (TGF β R-LBD) из средства, связывающего TGF β . Варианты, охватываемые настоящим изобретением, могут содержать TGF β R-LBD, который идентичен или практически идентичен структурированному лиганд-связывающему домену, обнаруженному в эктодомене (ECD) рецепторов TGF β (в том числе у человека, животных и т. п.). В дополнительных вариантах осуществления изменение в аминокислотной последовательности происходит в мультимеризующем домене. В еще одних вариантах осуществления изменение в аминокислотной последовательности происходит в первом и/или втором линкере. Следует понимать, что изменение может происходить в нескольких областях полипептида или средства, связывающего TGF β , при условии сохранения требуемой функции.

[0149] В некоторых вариантах осуществления полипептид или средство, связывающее TGF β , по настоящему изобретению могут быть конъюгированы, например, с нацеливающим средством, терапевтическим фрагментом (для терапевтических целей) или с выявляемым фрагментом (т. е. для выявления или диагностических целей).

[0150] В иллюстративном варианте осуществления полипептид или средство, связывающее TGF β , по настоящему изобретению конъюгированы с терапевтическим фрагментом, таким как, например и без ограничения, химиотерапевтическое средство, цитокин,

цитотоксическое средство, противофиброзное лекарственное средство, противораковое лекарственное средство (например, малая молекула), одноцепочечное антитело и т. п.

[0151] В другом иллюстративном варианте осуществления полипептид или средство, связывающее TGF β , по настоящему изобретению конъюгированы с выявляемым фрагментом, включая, например и без ограничения, фрагмент, выявляемый посредством спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических, химических и/или других физических методов. Выявляемый фрагмент может быть соединен непосредственно или опосредованно (например, посредством связи, такой как без ограничения связь DOTA или NHS) со средством, связывающим TGF β , с применением способов, хорошо известных из уровня техники. Можно использовать широкий спектр выявляемых фрагментов, выбор которых зависит от требуемой чувствительности, простоты конъюгирования, требований к стабильности и доступного оборудования. Подходящий выявляемый фрагмент может предусматривать без ограничения флуоресцентную метку, радиоактивную метку (например без ограничения ^{125}I , In^{111} , Tc^{99} , I^{131} , в том числе позитрон-излучающие изотопы для ПЕТ-сканера и т. п.), активную метку для ядерного магнитного резонанса, люминесцентную метку, хемилюминесцентную метку, хромофорную метку, ферментативную метку (например и без ограничения пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и т. п.), квантовые точки и/или наночастицу. Выявляемый фрагмент может вызывать и/или генерировать выявляемый сигнал, что позволяет выявлять сигнал от выявляемого фрагмента.

[0152] Терапевтический фрагмент может предусматривать, например и без ограничения, иттрий-90, скандий-47, рений-186, йод-131, йод-125 и многие другие, признанные специалистами в данной области техники (например, лютеций (например, Lu^{177}), висмут (например, Bi^{213}), медь (например, Cu^{67})), 5-фторурацил, адриамицин, иринотекан, таксаны, эндотоксин бактерий рода *Pseudomonas*, рицин, ауристатины (например, монометилауристатин E, монометилауристатин F), майтанзиноиды (например, мертанзин) и другие токсины.

[0153] В другом варианте осуществления терапевтический фрагмент может предусматривать другое терапевтическое средство для лечения TGF β -ассоциированного заболевания или состояния. Например и без ограничения, одна или несколько полипептидных конструкций или средство, связывающее TGF β , могут быть связаны с цитотоксическим лекарственным средством для получения конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC).

[0154] Нацеливающее средство может содержать, например, аминокислотную последовательность для доставки полипептида или средства, связывающего TGFβ, в требуемую ткань, орган или место в организме субъекта. Например и без ограничения, нацеливающее средство может содержать мотив полиаспарататной последовательности для нацеливания на кость, или антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

[0155] В других иллюстративных вариантах осуществления нацеливающее средство, терапевтический фрагмент или диагностический фрагмент могут предусматривать, например и без ограничения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, одноцепочечное антитело), связывающее средство, характеризующееся аффинностью в отношении другого представителя семейства TGFβ или в отношении другой терапевтической мишени, средство лучевой терапии, средство для визуализации, флуоресцентный фрагмент, цитотоксическое средство, антимиотическое лекарственное средство, носитель на основе наночастиц, конъюгированное с полимером лекарственное средство, наноноситель, средство для визуализации, стабилизирующее средство, лекарственное средство, наноноситель и/или дендример.

[0156] Следует понимать, что сайт для конъюгирования не предназначен для ограничения, при условии, что функция полипептида или средства, связывающего TGFβ, не подвергается негативному воздействию. Например и без ограничения, нацеливающее средство, терапевтический фрагмент или выявляемый фрагмент могут быть конъюгированы в линкерной части полипептида или средства, связывающего TGFβ (например, в линкере, отличном от линкера на основе IDR), или в любом другом подходящем сайте, например, на его N-конце или в мультимеризующем домене.

Получение полипептидов и средств, связывающих TGFβ

[0157] Полипептид или средство, связывающее TGFβ, раскрытые в данном документе, могут быть получены посредством различных способов, известных специалистам в данной области техники, в том числе способов с применением рекомбинантной ДНК.

[0158] Для экспрессии полипептидов или средств, связывающих TGFβ, нуклеотидные последовательности, способные кодировать полипептидную цепь, описанную в данном документе, могут быть вставлены в вектор экспрессии, т. е. вектор, который содержит элементы для транскрипционного и трансляционного контроля вставленной кодирующей последовательности в конкретном хозяине. Эти элементы могут предусматривать регуляторные последовательности, такие как энхансеры, конститутивные и индуцируемые промоторы, а также 5'- и 3'-нетранслируемые области. Для конструирования таких векторов экспрессии можно использовать способы, хорошо известные специалистам в данной

области техники. Эти способы включают методики с применением рекомбинантной ДНК *in vitro*, синтетические методики, генетическую рекомбинацию *in vivo* и т. п.

[0159] Для экспрессии описанных в данном документе полипептидных цепей можно использовать различные векторы экспрессии и системы клеток-хозяев, известные специалистам в данной области техники. Они включают без ограничения микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные векторами экспрессии на основе рекомбинантной бактериофаговой, плазмидной или космидной ДНК; дрожжи, трансформированные дрожжевыми векторами экспрессии; системы клеток насекомых, инфицированные бакуловирусными векторами; системы клеток растений, трансформированные вирусными или бактериальными векторами экспрессии, и системы клеток животных. Для долгосрочного получения рекомбинантных белков в системах млекопитающих можно использовать стабильную экспрессию в линиях клеток млекопитающих. Например, нуклеотидными последовательностями, способными кодировать любую из описанных в данном документе полипептидных цепей, можно трансформировать линии клеток с применением векторов экспрессии, которые могут содержать вирусные точки начала репликации и/или эндогенные элементы для экспрессии и селектируемый или подходящий для визуализации маркерный ген в том же или в отдельном векторе. Настоящее изобретение не ограничивается применяемым вектором или клеткой-хозяином. В определенных вариантах осуществления, раскрытых в данном документе, нуклеиновые кислоты, способные кодировать полипептидные цепи, описанные в данном документе, могут быть лигированы с векторами экспрессии. В случае, если средство, связывающее TGF β , состоит из разных полипептидных цепей (т. е. первый полипептид и второй полипептид не идентичны), каждая из таких полипептидных цепей может быть лигирована с отдельными векторами или с одним и тем же вектором. В соответствии с настоящим изобретением полипептидные цепи средства, связывающего TGF β , могут кодироваться одним вектором или отдельными векторами (например, набором векторов). Клетки трансформируют требуемым вектором или набором векторов.

[0160] В качестве альтернативы, полипептидные цепи можно экспрессировать в системе для транскрипции *in vitro* или объединенной системе для транскрипции/трансляции *in vitro* соответственно или в любой такой бесклеточной системе.

[0161] Клетки-хозяева, содержащие нуклеотидные последовательности, можно культивировать в условиях для транскрипции соответствующей РНК (mRNA и т. п.) и/или экспрессии и секреции полипептида(полипептидов) из культуры клеток. В иллюстративном варианте осуществления векторы экспрессии, содержащие нуклеотидные

последовательности, способные кодировать описанные в данном документе полипептидные цепи, могут быть разработаны таким образом, что они содержат сигнальные последовательности, которые управляют секрецией полипептида через мембрану прокариотической или эукариотической клетки.

5 **[0162]** Вследствие присущей генетическому коду вырожденности можно получать и использовать последовательности ДНК, которые кодируют ту же, практически ту же или функционально эквивалентную аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности по настоящему изобретению могут быть сконструированы с применением способов, как правило, известных из уровня техники, для изменения
10 нуклеотидных последовательностей в различных целях, включая без ограничения модификацию клонирования, обработки и/или экспрессии продукта гена. Перестановку фрагментов ДНК посредством случайной фрагментации и повторную ПЦР-сборку фрагментов генов и синтетических олигонуклеотидов можно использовать для конструирования нуклеотидных последовательностей. Например, олигонуклеотид-
15 опосредованный сайт-направленный мутагенез можно использовать для введения мутаций, которые создают новые сайты рестрикции, изменяют профили гликозилирования, изменяют предпочтение кодонов, обеспечивают варианты сплайсинга и т. д. Кодон-оптимизированные нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные в данном документе полипептидные цепи, охватываются настоящим изобретением.

20 **[0163]** Кроме того, штамм клеток-хозяев может быть выбран по его способности модулировать экспрессию вставленных последовательностей или процессировать экспрессируемый полипептид требуемым образом. Различные клетки-хозяева, которые имеют специфический клеточный механизм и характерные механизмы посттрансляционных активностей (например, CHO, HeLa, MDCK, HEK293 и W138),
25 доступны коммерчески и из Американской коллекции типовых культур (ATCC) и могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессируемого полипептида.

[0164] Специалисты в данной области техники также легко поймут, что последовательности нуклеиновой кислоты и полипептидные последовательности можно
30 синтезировать полностью или частично с применением химических или ферментативных способов, хорошо известных из уровня техники. Например, синтез пептидов можно проводить с применением различных твердофазных методик, а для автоматизации синтеза можно использовать такие аппараты, как синтезатор пептидов ABI 431A (PE Biosystems). Если это необходимо, аминокислотная последовательность может быть изменена в ходе

синтеза и/или объединена с последовательностями из других белков с получением вариантного белка.

Фармацевтические композиции

[0165] Настоящее изобретение также охватывает фармацевтические композиции, содержащие полипептиды или средства, связывающие TGF β , раскрытые в данном документе. Фармацевтическая композиция обычно содержит полипептид или средство, связывающее TGF β , раскрытое в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0166] Получение фармацевтических композиций можно осуществлять как известно из уровня техники (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, 2000). Например, терапевтическое соединение и/или композицию вместе с одним или несколькими твердыми или жидкими фармацевтическими веществами-носителями и/или добавками (или вспомогательными веществами) и, если это необходимо, в комбинации с другими фармацевтически активными соединениями, обладающими терапевтическим или профилактическим действием, вводят в подходящую форму для введения или лекарственную форму, которая затем может быть использована в качестве фармацевтического средства в человеческой или ветеринарной медицине. Фармацевтические препараты также могут содержать добавки, многие из которых известны из уровня техники, например, наполнители, разрыхлители, связующие средства, смазывающие вещества, смачивающие средства, стабилизаторы, эмульгаторы, диспергирующие вещества, консерванты, подсластители, красители, вкусоароматические средства, ароматизаторы, загустители, разбавители, буферные вещества, растворители, солюбилизаторы, средства для достижения депо-эффекта, соли для изменения осмотического давления, средства для нанесения покрытий или антиоксиданты.

[0167] Термин "фармацевтическая композиция" означает композицию, содержащую полипептид или средство, связывающее TGF β , описанные в данном документе, и по меньшей мере один компонент, предусматривающий фармацевтически приемлемые носители, разбавители, адъюванты, вспомогательные вещества или среды-носители, такие как консервирующие средства, наполнители, разрыхляющие средства, смачивающие средства, эмульгирующие средства, суспендирующие средства, подслащивающие средства, средства, придающие вкус или запах, отдушки, антибактериальные средства, противогрибковые средства, смазывающие средства и диспергирующие средства, в зависимости от характера способа введения и лекарственных форм.

[0168] Термин "фармацевтически приемлемый носитель" используют для обозначения любого носителя, разбавителя, адьюванта, вспомогательного вещества или среды-носителя, как описано в данном документе или как известно из уровня техники. Примеры суспендирующих средств включают этоксилированные изостеариловые спирты, сложные полиоксиэтиленовые эфиры сорбита и сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метасиликат алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант или смеси этих веществ. Предупреждение действия микроорганизмов может быть обеспечено различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой и т. п. Также может потребоваться включение изотонических средств, например, сахаров, хлорида натрия и т. п. Пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть достигнута за счет применения средств, задерживающих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина. Неограничивающие примеры подходящих носителей, разбавителей, растворителей или сред-носителей включают воду, растворы солей, фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), желатины, масла, спирты, многоатомные спирты, их подходящие смеси, растительные масла (такие как оливковое масло) и инъекционные сложные органические эфиры, такие как этилолеат. Неограничивающие примеры вспомогательных веществ включают лактозу, молочный сахар, цитрат натрия, карбонат кальция и дикальций-фосфат. Неограничивающие примеры разрыхляющих средств включают крахмал, альгиновые кислоты и некоторые сложные силикаты. Неограничивающие примеры смазывающих веществ включают стеарат магния, лаурилсульфат натрия, тальк, а также полиэтиленгликоли с высокой молекулярной массой.

[0169] Термин "фармацевтически приемлемый" означает пригодность, в рамках здравого медицинского суждения, для применения в контакте с клетками субъекта, например, людей и животных, без нежелательной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т. п., и соответствие разумному соотношению польза/риск.

[0170] Фармацевтически приемлемый носитель может предусматривать любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, задерживающие абсорбцию, и т. п., которые физиологически совместимы. В одном варианте осуществления носитель является подходящим для парентерального введения. Носитель может быть подходящим для внутривенного, интраперитонеального, подкожного или внутримышечного введения. В качестве альтернативы, носитель может быть подходящим для сублингвального или перорального введения. В других вариантах осуществления носитель является подходящим

для местного введения или для введения посредством ингаляции. Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального изготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсии. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно из уровня техники. За исключением случаев, когда любые обычные среда или средство несовместимы с активным соединением, предусматривается их применение в фармацевтических композициях, предусмотренных в данном документе. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в композиции. Например, фармацевтическая композиция, предусмотренная в данном документе, может дополнительно содержать по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, как дополнительно обсуждается ниже.

[0171] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, предусмотренную в данном документе, можно вводить перорально, например, в форме пилюль, таблеток, глазированных таблеток, таблеток, покрытых сахаром, гранул, твердых и мягких желатиновых капсул, водных, спиртовых или масляных растворов, сиропов, эмульсий или суспензий, или ректально, например, в форме суппозитория.

[0172] В других вариантах осуществления фармацевтическую композицию, предусмотренную в данном документе, можно вводить парентерально, например, подкожно, внутримышечно или внутривенно в форме растворов для инъекции или инфузии. Другими подходящими формами введения являются, например, чрескожное или местное введение, например, в форме мазей, кремов, настоек, спреев или трансдермальных терапевтических систем, или ингаляционное введение в форме назальных спреев или аэрозольных смесей, или, например, микрокапсул, имплантатов или облаток.

[0173] Фармацевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях изготовления и хранения. Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством применения покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и посредством применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительно включить в композицию изотонические средства, например, сахара, многоатомные спирты,

такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута посредством включения в композицию средства, которое задерживает абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина. Более того, соединение можно вводить в составе с временным высвобождением, например, в композиции, которая содержит полимер с медленным высвобождением. Соединение может быть получено с носителями, которые будут защищать от быстрого высвобождения, например, в виде состава с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир, полимолочная кислота и сополимеры полимолочной и полигликолевой кислот (PLG).

[0174] Многие способы получения таких составов обычно известны специалистам в данной области техники. Стерильные инъекционные растворы можно получать посредством включения активного соединения, такого как полипептид или средство, связывающее TGF β , предусмотренные в данном документе, в требуемом количестве в соответствующем растворителе с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией посредством фильтрования. Как правило, дисперсии получают посредством включения активного соединения в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов обычными способами получения являются вакуумное высушивание и лиофилизация, которые позволяют получить порошок активного ингредиента и любой дополнительный требуемый ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора. Соединения также могут быть составлены с одним или несколькими дополнительными соединениями, которые повышают их растворимость.

[0175] Часто бывает выгодно составлять композиции (например, композиции для парентерального введения) в единичной лекарственной форме для облегчения введения и однородности дозировки. Термин "единичная лекарственная форма" относится к физически дискретной единице, подходящей в качестве однократных дозировок для субъектов-людей и других животных, при этом каждая единица содержит предварительно определенное количество активного материала, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта, в ассоциации с подходящим фармацевтическим носителем. Описание единичных лекарственных форм по настоящему изобретению может варьироваться, определяется и напрямую зависит от (а) уникальных характеристик

терапевтического соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, а также (б) ограничений, присущих уровню техники составления такого терапевтического соединения для предупреждения или лечения TGFβ-ассоциированного заболевания или нарушения. Дозировки дополнительно обсуждаются ниже.

- 5 **[0176]** В некоторых вариантах осуществления предусмотрены фармацевтические композиции, которые содержат эффективное количество полипептида и/или средства, связывающего TGFβ, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемые носитель. В одном варианте осуществления предусмотрены фармацевтические композиции для лечения или предупреждения фиброза, содержащие полипептид или средство, связывающее TGFβ, описанное в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция для задержки прогрессирования рака, для подавления инвазии рака, например, инвазии злокачественных глиальных клеток (MGC), для подавления роста, выживания, образования сфероидов и/или пролиферации раковых стволовых клеток, для подавления метастазирования, для подавления рецидива рака и/или для преодоления химиорезистентности рака, при этом композиция содержит полипептид и/или средство, связывающее TGFβ, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция для лечения или предупреждения состояния недостаточности костного мозга.
- 20 **[0177]** Используемые в данном документе термины "фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтический носитель" известны из уровня техники и включают без ограничения 0,01-0,1 М или 0,05 М фосфатный буфер или 0,8% физиологический раствор. Кроме того, такие фармацевтически приемлемые носители могут представлять собой водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат.
- 25 Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и буферные среды. Среда-носители для парентерального введения включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактированный раствор Рингера или нелетучие масла. Среда-носители для внутривенного введения включают средства для восполнения жидкости и питательных веществ, средства для восполнения электролитов, например, на основе декстрозы Рингера, и т. п. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, средства для анализа, инертные газы и т. п.
- 30

[0178] Для любого соединения терапевтически эффективная доза может быть первоначально определена либо в анализах с применением культур клеток, либо на животных моделях, таких как мыши, крысы, кролики, собаки или свиньи. Животную модель также можно использовать для определения диапазона концентраций и пути введения. Такую информацию затем можно использовать для определения применимых доз и путей введения людям. Эти методики хорошо известны специалисту в данной области техники, а терапевтически эффективная доза относится к такому количеству активного ингредиента, которое снижает интенсивность проявления симптомов или состояния. Терапевтическая эффективность и токсичность могут быть определены посредством стандартных фармацевтических процедур в культурах клеток или на экспериментальных животных, например, посредством расчета и сравнения ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции) и LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции). Любая из описанных в данном документе фармацевтических композиций может быть применена к любому субъекту, нуждающемуся в терапии, включая без ограничения млекопитающих, таких как собаки, кошки, коровы, лошади, кролики, обезьяны и особенно люди.

[0179] Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, можно вводить любым из ряда путей, включая без ограничения пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, внутрижелудочковый, трансдермальный, подкожный, интраперитонеальный, интраназальный, энтеральный, местный, сублингвальный или ректальный способы.

Способы применения

[0180] Полипептид или средство, связывающее TGFβ, описанные в данном документе, и фармацевтические композиции на их основе применимы для предупреждения или лечения TGFβ-ассоциированного заболевания или состояния. Таким образом, предусмотрены способы предупреждения или лечения TGFβ-ассоциированного заболевания или состояния у субъекта, при этом способы включают введение терапевтически эффективного количества полипептида, средства, связывающего TGFβ, или фармацевтической композиции, описанных в данном документе. Полипептиды и средства, связывающие TGFβ, обычно вводят в форме фармацевтической композиции. Субъект может нуждаться в таком лечении, т. е. у него имеется заболевание или состояние, ассоциированное с TGFβ (например, TGFβ1 и/или TGFβ3), подозрение на его наличие, или субъект характеризуется риском его возникновения.

[0181] Используемый в данном документе термин "TGFβ-ассоциированное заболевание или состояние" относится к заболеваниям или состояниям, интенсивность проявления

которых можно снижать посредством подавления активности TGF β , в частности активности TGF β 1 и/или TGF β 3. TGF β -ассоциированные заболевания или состояния включают без ограничения заболевания или состояния, ассоциированные со сверхэкспрессией или сверхактивацией лигандов TGF β , в частности TGF β 1 и/или TGF β 3. В некоторых вариантах осуществления а TGF β -ассоциированное заболевание или состояние опосредовано TGF β 1 и/или TGF β 3. В одном варианте осуществления заболевание или состояние, подлежащее лечению, опосредовано TGF β 3. В другом варианте осуществления заболевание или состояние, подлежащее лечению, опосредовано комбинацией TGF β 1 и TGF β 3. Используемый в данном документе термин "снижение интенсивности проявления" означает снижение, супрессию, смягчение, снижение степени проявления, остановку или стабилизацию развития или прогрессирования заболевания.

[0182] Примеры TGF β -ассоциированных заболеваний или состояний, которые можно предупреждать или лечить в соответствии с настоящим изобретением, включают без ограничения фиброз (например, фиброзное заболевание, фиброзное рубцевание, фибропролиферативные нарушения); рак (например, злокачественные новообразования, солидные опухоли, метастазирование) и виды недостаточности костного мозга (например, синдром Швахмана-Бодиана-Даймонда, анемию Фанкони); глазные заболевания и генетические нарушения соединительной ткани.

[0183] В некоторых вариантах осуществления полипептид или средство, связывающее TGF β , описанные в данном документе, используют для лечения или предупреждения фиброза, включая, например и без ограничения, фиброзное заболевание тканей и/или органов, фиброзное рубцевание и фибропролиферативные нарушения. Неограничивающие примеры фиброзных заболеваний или состояний, которые можно лечить или предупреждать, включают легочный фиброз (например, идиопатический легочный фиброз), почечный фиброз, фиброз печени (например, цирроз печени), системный склероз, склеродермию, фиброз кожи, фиброз сердца, фиброз костного мозга и миелофиброз. В одном конкретном варианте осуществления лечат или предупреждают системный склероз (SSc). В другом конкретном варианте осуществления лечат или предупреждают склеродермию. В другом конкретном варианте осуществления лечат или предупреждают миелофиброз (MF).

[0184] Системный склероз (SSc, также называемый склеродермией) является тяжелым изнурительным фиброзным заболеванием. TGF β является мощным профибротическим цитокином, который, как было показано, имеет решающее значение для стимуляции нескольких патологических процессов, включая повышенное отложение коллагена в коже

и легких при SSc (Varga, J. and Abraham, D., 2007; Varga, J. and Whitfield, M.L., 2009; Gabrielli, A. et al., 2009; Lafyatis, R., 2014; Allanore, Y. et al., 2015). SSc представляет собой серьезную терапевтическую проблему, при этом продолжительность жизни пациентов с недавно диагностированным SSc составляет около одиннадцати лет (Mayes, M.D. et al., 2003). Недавнее клиническое исследование подтвердило роль TGFβ как фактора, вызывающего фиброз у пациентов-людей с SSc, продемонстрировав резкую реверсию фиброза после блокады TGFβ нейтрализующим антителом фрезолимумабом (Rice, L.M. et al., 2015). Это клиническое доказательство, наряду с обширными доклиническими данными, демонстрирующими важность TGFβ в развитии фиброза при SSc и других заболеваниях, обеспечивает убедительное обоснование для применения средств, связывающих TGFβ, в соответствии с настоящим изобретением для лечения пациентов с SSc.

[0185] При миелофиброзе (MF) фиброз костного мозга является отличительной чертой заболевания, и его степень коррелирует с клиническими признаками, включая анемию. Было показано, что введение средства, блокирующего TGFβ, приводит к разрешению миелофиброза в нескольких доклинических исследованиях (Wang, J.C. et al., 2006; Vannucchi, AM et al., 2005), и это подтверждает двойную патологическую роль TGFβ при MF, а именно стимулирование фиброза костного мозга, а также миелопролиферации. У пациентов с MF были задокументированы повышенные уровни TGFβ внутри тромбоцитов, а также TGFβ, ассоциированного с мононуклеарными клетками периферической крови и мегакариоцитами. Сверхэкспрессия TGFβ в клинических образцах наряду с обширными доклиническими данными о влиянии нейтрализации TGFβ в моделях MF обеспечивает убедительное обоснование для применения средств, связывающих TGFβ, в соответствии с настоящим изобретением для лечения пациентов с MF.

[0186] Другие иллюстративные варианты фиброза, которые можно предупреждать или лечить, включают, например и без ограничения, интерстициальное заболевание легких; фиброзное заболевание легких человека (например, облитерирующий бронхиолит, идиопатический легочный фиброз, легочный фиброз известной этиологии, опухолевую строму при заболевании легких, системный склероз, поражающий легкие, синдром Германского-Пудлака, пневмокониоз шахтера, асбестоз, силикоз, хроническую легочную гипертензию); AIDS-ассоциированные типы фиброза, поддающиеся лечению, включая фиброз легких, кистозный фиброз, фиброз печени, фиброз сердца, медиастинальный фиброз, фиброз ретроперитонеальной полости, фиброз костного мозга, фиброз кожи; склеродермию и системный склероз. Конкретные формы фиброза, которые можно лечить

или предупреждать, включают формы фиброза, которые поражают любой орган, или ткань, или клетку организма, например, фибробласты теноновой капсулы человека, почку, легкое, кишечник, печень, сердце, костный мозг, половые органы, кожу и глаз. Эти заболевания включают без ограничения кистозный фиброз, системный склероз, хроническую
5 обструктивную болезнь легких (COPD), контрактуру Дюпюитрена, гломерулонефрит, фиброз печени, постинфарктный сердечный фиброз, рестеноз, фиброз, вызванный офтальмологическим хирургическим вмешательством, и рубцевание. Также можно лечить генетические нарушения соединительной ткани, и они включают без ограничения синдром Марфана (MFS) и несовершенный остеогенез.

10 **[0187]** В некоторых вариантах осуществления полипептид или средство, связывающее TGF β , описанные в данном документе, используют для подавления дифференцировки фибробластов в миофибробласты.

[0188] В некоторых вариантах осуществления полипептид или средство, связывающее TGF β , описанные в данном документе, используют для лечения или предупреждения
15 фибропролиферативного нарушения. Фибропролиферативные нарушения характеризуются пролиферацией фибробластов и соответствующей сверхэкспрессией белка внеклеточного матрикса, такого как фибронектин, ламинин и коллаген.

[0189] В некоторых вариантах осуществления полипептид или средство, связывающее TGF β , описанные в данном документе, используют для лечения или предупреждения рака,
20 включая, например и без ограничения, рак легкого, рак головы и шеи, меланому, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак печени, рак молочной железы, эпителиальный рак, холангиокарциному, солидные опухоли и т. п. В некоторых вариантах осуществления термин "предупреждение" в отношении рака может включать предупреждение инвазии или метастазирования основной опухоли. В некоторых вариантах
25 осуществления термин "лечение" в отношении рака может включать подавление TGF β -опосредованной супрессии иммунного ответа в микроокружении опухоли. Что касается солидных опухолей, иммуносупрессивная роль TGF β в микроокружении опухоли была четко продемонстрирована доклинически. Кроме того, недавно в клиническом исследовании было показано, что отсутствие ответа на ингибитор контрольных точек
30 иммунного ответа у пациентов с раком мочевого пузыря ассоциировано с передачей сигнала TGF β в микроокружении опухоли, что подтверждает концепцию о том, что TGF β сдерживает противоопухолевый иммунитет, и позволяет предположить, что ингибиторы TGF β могут характеризоваться активностью единственного средства в условиях некоторых

опухолей и действовать в условиях других опухолей для усиления противоопухолевой активности в сочетании с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа.

[0190] В некоторых вариантах осуществления полипептидную конструкцию или средство, связывающее TGF β , описанные в данном документе, используют для лечения или предупреждения заболевания, характеризующегося аномальным ростом клеток и/или дисрегуляцией апоптоза. Примеры таких заболеваний включают без ограничения рак, мезотелиому, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную меланому, рак яичника, рак молочной железы, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, рак кости, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта (рак желудка, колоректальный рак и/или рак двенадцатиперстной кишки), хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягкой ткани, рак уретры, рак полового члена, рак яичка, гепатоцеллюлярный рак (рак печени и/или желчных протоков), первичную или вторичную опухоль центральной нервной системы, первичную или вторичную опухоль головного мозга, болезнь Ходжкина, хронический или острый лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфоцитарную лимфому, лимфобластный лейкоз, фолликулярную лимфому, лимфоидные злокачественные новообразования Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланому, множественную миелому, рак полости рта, немелкоклеточный рак легкого, рак предстательной железы, мелкоклеточный рак легкого, рак почки и/или мочеочника, почечноклеточную карциному, карциному почечной лоханки, неоплазии центральной нервной системы, первичную лимфому центральной нервной системы, неходжкинскую лимфому, опухоли позвоночника, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, аденокортикальный рак, рак желчного пузыря, рак селезенки, холангиокарциному, фибросаркому, нейробластому, ретинобластому или их комбинацию.

[0191] В некоторых вариантах осуществления полипептидную конструкцию или средство, связывающее TGF β , описанные в данном документе, используют для лечения или предупреждения заболевания или нарушения, выбранного из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака головного мозга, рака молочной железы, рака костного мозга, рака шейки матки, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака пищевода, гепатоцеллюлярного рака, лимфобластного лейкоза, фолликулярной лимфомы, лимфоидных злокачественных новообразований Т-клеточного

или В-клеточного происхождения, меланомы, миелогенного лейкоза, миеломы, рака полости рта, рака яичника, немелкоклеточного рака легкого, рака предстательной железы, мелкоклеточного рака легкого и рака селезенки.

[0192] В некоторых вариантах осуществления полипептидную конструкцию или средство, связывающее TGF β , описанные в данном документе, используют для лечения или предупреждения заболевания или нарушения, которое представляет собой гематологический рак, такой как лейкоз, лимфома или миелома. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы (NHL), кожной В-клеточной лимфомы, лимфомы из активированных В-клеток, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), мантийноклеточной лимфомы (MCL), лимфомы из клеток фолликулярного центра, трансформированной лимфомы, лимфоцитарной лимфомы промежуточной дифференцировки, промежуточной лимфоцитарной лимфомы (ILL), диффузной плохо дифференцированной лимфоцитарной лимфомы (PDL), centroцитарной лимфомы, диффузной мелкоклеточной лимфомы с расщепленными ядрами (DSCCL), периферических Т-клеточных лимфом (PTCL), кожной Т-клеточной лимфомы, лимфомы мантийной зоны, фолликулярной лимфомы низкой степени злокачественности, множественной миеломы (MM), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), миелодиспластического синдрома (MDS), острого Т-клеточного лейкоза, острого миелоидного лейкоза (AML), острого промиелоцитарного лейкоза, острого миелобластного лейкоза, острого мегакариобластного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза из предшественников В-клеток, острого лимфобластного лейкоза из предшественников Т-клеток, лейкоза Беркитта (лимфомы Беркитта), острого бифенотипического лейкоза, хронической миелоидной лимфомы, хронического миелогенного лейкоза (CML) и хронического моноцитарного лейкоза. В конкретном варианте осуществления заболевание или нарушение представляет собой миелому. В конкретном варианте осуществления заболевание или нарушение представляет собой миелодиспластические синдромы (MDS). В другом конкретном варианте осуществления заболевание или нарушение представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML). В другом конкретном варианте осуществления заболевание или нарушение представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). В еще одном конкретном варианте осуществления миелома представляет собой множественную миелому (MM).

[0193] В других вариантах осуществления полипептидную конструкцию или средство, связывающее TGF β , описанные в данном документе, используют для лечения или

предупреждения заболевания или нарушения, которое представляет собой солидное опухолевое злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления солидное опухолевое злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из карциномы, аденокарциномы, адренокортикальной карциномы, аденокарциномы толстой кишки, колоректальной аденокарциномы, колоректальной карциномы, карциномы из клеток протоков, карциномы легкого, карциномы щитовидной железы, назофарингеальной карциномы, меланомы, немеланомной карциномы кожи и рака легкого.

[0194] В некоторых вариантах осуществления солидное опухолевое злокачественное новообразование представляет собой первичную солидную опухоль поздней стадии, отличную от опухоли ЦНС. В некоторых вариантах осуществления солидное опухолевое злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из желудочного рака/рака желудочно-пищеводного соединения (GEJ), рака мочевого пузыря/уротелиального рака и немелкоклеточного рака легкого (NSCLC).

[0195] В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа для введения в комбинации с полипептидом или средством, связывающим TGF β , описанным в данном документе, может представлять собой любое фармацевтическое средство, которое подавляет или блокирует активность молекулы, подавляющей контрольные точки иммунного ответа. В конкретных вариантах осуществления активность заключается в связывании с природным партнером по связыванию молекулы контрольных точек иммунного ответа. Если молекула контрольных точек иммунного ответа является рецептором, активность может представлять собой лиганд-связывающую активность. Если молекула контрольных точек иммунного ответа является лигандом, активность может представлять собой рецептор-связывающую активность.

[0196] В конкретных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа для введения в комбинации с полипептидом или средством, связывающим TGF β , описанным в данном документе, представляет собой отрицательный регулятор контрольных точек, который участвует в активации Т-клеток. В некоторых более конкретных вариантах осуществления такой отрицательный регулятор контрольных точек представляет собой антиген-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), CD80, CD86, белок 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1), лиганд 1 белка запрограммированной гибели клеток (PD-L1), лиганд 2 белка запрограммированной гибели клеток (PD-L2), продукт гена-3, активирующий лимфоциты (LAG-3; также известный как CD223), галектин-3, аттенуатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA), белок 3 мембраны Т-клеток (TIM3), галектин-9 (GAL9), B7-H1, B7-H3, B7-H4, Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и

ITIM (TIGIT/Vstm3/WUCAM/VSIG9), супрессор активации Т-клеток с V-доменом Ig (VISTA), белок, родственный индуцируемому глюкокортикоидами рецептору фактора некроза опухоли (GITR), медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), OX40, CD27, CD28, CD137, CGEN-15001T, CGEN-15022, CGEN-15027, CGEN-15049, CGEN-15052 или CGEN-15092. Обзор таких регуляторов контрольных точек и лекарственных средств, которые нацеливаются на них, изложен в таблице 1. В конкретном варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой ингибитор PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, LAG3, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, IDO или TDO.

[0197] В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа может представлять собой антитело, малую молекулу или олигонуклеотид (такой как аптамер, shRNA, miRNA, siRNA или антисмысловая ДНК). В конкретных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа был одобрен Управлением по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) в США или зарубежным аналогичным агентством для лечения рака или заболевания, вызванного патогеном.

[0198] В конкретных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой антитело, которое связывается с контрольной точкой иммунного ответа и подавляет ее активность. Антитела, которые могут быть ингибиторами контрольных точек иммунного ответа, включают без ограничения моноклональные антитела (включая Fc-оптимизированные моноклональные антитела), поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), фрагменты антител, сохраняющие антигенсвязывающую активность, такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител (например, scFv), полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител, и слитые белки, содержащие фрагменты антител. В конкретном варианте осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. Предпочтительно антитело представляет собой гуманизированное антитело.

[0199] В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой ингибитор PD-1. В конкретном варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой моноклональное антитело, которое связывается с PD-1 и подавляет его активность (например, лиганд-связывающую активность).

[0200] В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пидилизумаба, MEDI0680, пембролизумаба, AMP-224,

AMP-514, STI-A1110, TSR-042, AUR-012, цемиплимаба, спартализумаба, камрелизумаба, синтилимаба, тислелизумаба и торипалимаба.

[0201] В конкретном варианте осуществления моноклональное антитело представляет собой ниволумаб, пидилизумаб, MEDI0680 или пембролизумаб. В дополнительном

5 конкретном варианте осуществления моноклональное антитело представляет собой ниволумаб. В другом конкретном варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа, который является ингибитором PD-1, представляет собой AMP-224. В другом конкретном варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа, который является ингибитором PD-1, представляет собой пидилизумаб. В другом
10 конкретном варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа, который является ингибитором PD-1, представляет собой пембролизумаб. В другом конкретном варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа, который является ингибитором PD-1, представляет собой MEDI0680. В другом конкретном варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа, который
15 является ингибитором PD-1, представляет собой STI-A1110. В другом конкретном варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа, который является ингибитором PD-1, представляет собой TSR-042. В другом конкретном варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа, который является ингибитором PD-1, представляет собой AUR-012.

20 **[0202]** В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой ингибитор PD-L1. В конкретном варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой моноклональное антитело, которое связывается с PD-L1 и подавляет его активность (например, рецептор-связывающую активность).

25 **[0203]** В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа выбран из группы, состоящей из mpdl3280A, дурвалумаба, авелумаба, BMS-936559, атезолизумаба, RG7446 и STI-A1010.

[0204] В конкретном варианте осуществления моноклональное антитело представляет собой mpdl3280A, дурвалумаб, авелумаб, BMS-936559 или атезолизумаб. В другом
30 конкретном варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа, который является ингибитором PD-L1, представляет собой RG7446. В другом конкретном варианте осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа, который является ингибитором PD-L1, представляет собой STI-A1010.

[0205] В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой ингибитор CTLA4 (например, ипилимумаб).

[0206] В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой ингибитор LAG3 (например, BMS-986016).

5 [0207] В определенных вариантах осуществления ингибиторы контрольных точек иммунного ответа для введения в комбинации с полипептидом или средством, связывающим TGF β , описанным в данном документе, включают без ограничения OPDIVO® (ниволумаб); YERVOY® (ипилиумаб); релатилимаб; линродостат; EMPLICITI® (элотузимаб); BMS-986258; BMS 986315; BMS-986207; BMS-986249 и BMS-
10 986218.

[0208] Ингибиторы PD-1, применимые в комбинациях, описанных в данном документе, включают любую молекулу, способную подавлять, блокировать, отменять или нарушать активность или экспрессию PD-1. В частности, ингибитор антитела PD-1 может представлять собой низкомолекулярное соединение, нуклеиновую кислоту, полипептид,
15 антитело, пептитело, диатело, миниантитело, однодоменное антитело или нанотело, одноцепочечный вариабельный фрагмент (ScFv) или их функциональный фрагмент или вариант. В одном случае ингибитор PD-1 представляет собой низкомолекулярное соединение (например, соединение с молекулярной массой менее чем приблизительно 1000 Да). В других вариантах осуществления применимые ингибиторы PD-1 в комбинациях,
20 описанных в данном документе, включают нуклеиновые кислоты и полипептиды.

[0209] В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы предупреждения или подавления рецидива рака после лечения, например, после лечения с применением лекарственного средства или хирургического иссечения. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы задержки прогрессирования рака, где повторный
25 рост рака задерживается на более чем 30%, или на более чем 50%, или на более чем 70%, и/или где увеличиваются периоды выживания пораженных субъектов. Дополнительно предусмотрены способы повышения эффективности противораковых средств терапии для лечения рака, выбранных из группы, включающей резекцию, химиотерапию, лучевую терапию, иммунотерапию и/или генную терапию, включающие введение полипептида или
30 средства, связывающего TGF β , описанных в данном документе, и одновременное, раздельное или последовательное введение указанного противоракового средства терапии. Термин "повышение эффективности противораковой терапии", используемый в данном документе, относится к улучшению традиционных способов лечения рака и включает уменьшение количества противораковой композиции, которая применяется в ходе

традиционного лечения рака, например, интенсивности излучения при лучевой терапии, уменьшение количества химиотерапевтических средств при химиотерапии, иммунотерапевтических средств при иммунотерапии или векторов при способах генной терапии, и/или к повышению эффективности традиционной терапии и противораковой композиции при применении в традиционных дозах или количествах в ходе традиционной противораковой терапии. В одном варианте осуществления повышение эффективности противораковой терапии относится к повышению выживаемости субъектов, проходящих терапию.

[0210] В некоторых вариантах осуществления полипептид или средство, связывающее TGF β , описанные в данном документе, используют для лечения или предупреждения недостаточности костного мозга у субъекта, например, человека, у которого имеется недостаточность костного мозга или который характеризуется риском ее развития. Иллюстративные типы недостаточности костного мозга включают без ограничения SDS (также известный как синдром Швахмана-Бодиана-Даймонда или SBDS), анемию Фанкони (FA), врожденный дискератоз (DC), врожденную амегакариоцитарную тромбоцитопению (CAMT), анемию Блекфана-Даймонда (BDA) и ретикулярный дисгенез (RD). Пациенты с синдромом Швахмана-Даймонда (SDS) страдают недостаточностью костного мозга, экзокринной дисфункцией поджелудочной железы, скелетными аномалиями и повышенным риском развития острого миелоидного лейкоза. В конкретном варианте осуществления полипептид или средство, связывающее TGF β , описанные в данном документе, используют для лечения или предупреждения анемии Фанкони (FA) у субъекта. В другом конкретном варианте осуществления полипептид или средство, связывающее TGF β , описанные в данном документе, используют для лечения или предупреждения синдрома Швахмана-Даймонда (SDS) у субъекта.

[0211] Анемия Фанкони (FA) является наиболее распространенным наследственным синдромом недостаточности костного мозга. У пациентов с FA в течение первого десятилетия жизни развивается недостаточность костного мозга вследствие истощения гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (HSPC). FA вызывается мутациями в одном из девятнадцати генов группы комплементации анемии Фанкони (FANC), продукты которых взаимодействуют в пути репарации ДНК FA/BRCA. Недостаточность костного мозга при FA может быть результатом, непосредственно или опосредованно, гиперактивации путей супрессии роста, индуцированной, в частности, генотоксическим стрессом. Канонический путь TGF β , опосредованный супрессией роста гемопоэтических стволовых клеток (HSC), был недавно идентифицирован как причина

недостаточности костного мозга при FA (Rio, P. and Bueren, J.A., 2016; Zhang, H. et al., 2016). Синдром Швахмана-Даймонда (SDS) является еще одним редким синдромом недостаточности костного мозга, который вызывается мутациями в гене SBDS (Boosock, G.R. et al., 2003; Rogers, Z.R., 2018). Было показано, что путь TGF β дисрегулируется в клетках, пораженных SDS. В совокупности такие результаты обеспечивают убедительное обоснование для применения средств, связывающих TGF β , в соответствии с настоящим изобретением для лечения синдромов недостаточности костного мозга.

[0212] В некоторых вариантах осуществления, таким образом, предусмотрен способ лечения или предупреждения недостаточности костного мозга, такой как SDS, при этом способ включает введение эффективного количества полипептида или средства, связывающего TGF β , в соответствии с настоящим изобретением субъекту, нуждающемуся в этом. В таких вариантах осуществления полипептид или средство, связывающее TGF β , способно снижать степень проявления или подавлять симптом или последствия, ассоциированные с SDS. Иллюстративные симптомы или последствия, ассоциированные с SDS, выбраны из группы, состоящей из нейтропении (например, при абсолютном количестве нейтрофилов < 1500/мл), анемии, тромбоцитопении (например, при количестве тромбоцитов меньше 50000/мм³), экзокринной дисфункции поджелудочной железы, задержки роста, хронической стеатореи, метафизарной дисплазии, миелодисплазии, дисплазии мегакариоцитов, эритроидной дисплазии, острого миелоидного лейкоза (AML) и генерализованной остеопении. Более подробное обсуждение недостаточности костного мозга см., например, в WO2016/138300 и WO2019/018662.

[0213] Используемые в данном документе термины "эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество" используются взаимозаменяемо в отношении количества или дозы соединения или композиции при однократном или многократном введении дозы субъекту, что обеспечивает требуемый эффект (например, требуемый биологический ответ или ответ на лекарственный препарат, например, снижение интенсивности проявления, снижение степени проявления или предупреждение заболевания, нарушения или состояния) у субъекта, подвергающегося лечению. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество или дозу соединения или композиции, которые предупреждают или лечат TGF β -ассоциированное заболевание или состояние у субъекта, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество или дозу соединения или композиции, которые подавляют одну или

несколько активностей TGF β (например, TGF β 1 и/или TGF β 3) у субъекта, как описано в данном документе.

[0214] Термин "подавление" или "подавляющий" используют в данном документе для общего обозначения снижения степени проявления, замедления, ограничения, задержки, супрессии, блокирования, нейтрализации, торможения или предупреждения процесса, например, без ограничения снижения или замедления роста, распространения или сокращения времени проявления TGF β -ассоциированного заболевания или состояния, такого как без ограничения фиброз, рак, или опухоль, или недостаточность костного мозга.

[0215] Термин "осуществление лечения" или "лечение" для целей настоящего изобретения относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, где объектом является снижение интенсивности проявления целевого заболевания или состояния. К нуждающимся в лечении относятся субъекты, у которых уже имеется нарушение, а также субъекты, склонные к развитию нарушения, или субъекты, у которых нарушение необходимо предупредить. В определенных вариантах осуществления "осуществление лечения" или "лечение" относится к снижению интенсивности проявления по меньшей мере одного физического параметра, такого как утолщение кожи, фиброзное рубцевание или размер, рост или миграция опухоли. В определенных вариантах осуществления "осуществление лечения" или "лечение" относится к подавлению или улучшению в отношении заболевания или состояния, либо физически (например, стабилизация выраженного симптома), либо физиологически (например, стабилизация физического параметра), либо и тем и другим образом. В определенных вариантах осуществления "осуществление лечения" или "лечение" относится к задержке начала (или рецидива) заболевания или состояния. Термин "осуществление лечения" или "лечение" может относиться к любым признакам успеха в лечении или снижении интенсивности проявления заболевания или состояния, включая любой объективный или субъективный параметр, такой как ослабление; ремиссия; снижение степени проявления симптомов или повышение переносимости заболевания или состояния субъектом; улучшение физического или психического состояния субъекта, например, снижение интенсивности боли или дискомфорта, испытываемых пациентом, и в некоторых ситуациях дополнительное улучшение по меньшей мере одного клинического параметра заболевания или состояния.

[0216] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения "осуществление лечения" относится к нейтрализации биологической активности избыточного TGF β . Это может быть определено с применением подходящих клинических переменных улучшения; посредством патологической оценки эффектов, например, фиброза и/или иммуносупрессии

или предупреждения фиброза; посредством прямого подавления передачи сигнала TGF β или посредством другого измерения, подходящего для заболевания или состояния, подвергающихся лечению.

[0217] Используемые в данном документе термины "осуществление предупреждения" или "предупреждение" относятся к по меньшей мере снижению вероятности развития, риска развития или предрасположенности к возникновению заболевания или нарушения (т. е. к обеспечению отсутствия проявления по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания у пациента, который может быть подвержен заболеванию, или предрасположен к развитию заболевания, или подвержен риску развития заболевания, но еще не испытывает или не демонстрирует симптомов заболевания). Термин "предупреждение" или "осуществление предупреждения" также используют для описания введения соединения или композиции, описанных в данном документе, субъекту, который подвержен риску развития такого заболевания или состояния (или предрасположен к его развитию). Субъекты, поддающиеся лечению для предупреждения заболевания или состояния, включают индивидуумов, подверженных риску развития заболевания или состояния, но не демонстрирующих симптомов, а также пациентов, у которых симптомы проявляются в данное время. В некоторых вариантах осуществления "предупреждение" или "осуществление предупреждения" используют для описания введения соединения или композиции, описанных в данном документе, субъекту, у которого было диагностировано заболевание или состояние, или который подвергался лечению заболевания или состояния и который подвержен риску рецидива заболевания или состояния.

[0218] В некоторых вариантах осуществления лечение или предупреждение находится в пределах контекста настоящего изобретения, если имеет место измеримая разница между показателями субъектов, подвергавшихся лечению с применением средств, связывающих TGF β , композиций и способов, предусмотренных в данном документе, по сравнению с представителями группы плацебо, контролем по анамнезу или последующими тестами, проводимыми с одним и тем же субъектом.

[0219] Термин "субъект" включает живые организмы с TGF β -ассоциированным заболеванием или состоянием, или предрасположенные к его возникновению, или подверженные риску его возникновения. Примеры субъектов включают млекопитающих, например, людей, обезьян, коров, кроликов, овец, коз, свиней, собак, кошек, крыс, мышей и их трансгенные виды. Термин "субъект" обычно включает животных, предрасположенных к возникновению состояний, характеризующихся TGF β -ассоциированными заболеваниями или состояниями, такими как фиброз или рак, например,

млекопитающих, например, приматов, например, людей. Животное также может представлять собой животную модель нарушения, например, мышиную модель, реципиента ксенотрансплантата и т. п. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек.

- 5 **[0220]** Нет конкретных ограничений по дозе каждого из средств, связывающих TGF β , для применения в композициях, предусмотренных в данном документе. Иллюстративные дозы включают миллиграммовые или микрограммовые количества соединения на килограмм веса субъекта или образца (например, от приблизительно 50 микрограмм на килограмм до приблизительно 500 миллиграмм на килограмм, от приблизительно 1 миллиграмма на килограмм до приблизительно 100 миллиграмм на килограмм, от приблизительно 1 миллиграмма на килограмм до приблизительно 50 миллиграмм на килограмм, от приблизительно 1 миллиграмма на килограмм до приблизительно 10 миллиграмм на килограмм или от приблизительно 3 миллиграмм на килограмм до приблизительно 5 миллиграмм на килограмм). Дополнительные иллюстративные дозы включают дозы от
- 10 приблизительно 5 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 300 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 200 мг, от приблизительно 50 до приблизительно 150 мг, или приблизительно 50, приблизительно 100, приблизительно 150 мг, приблизительно 200 мг или приблизительно 250 мг, и, например, один раз в сутки или два раза в сутки, или меньшие или большие количества.
- 20 **[0221]** В некоторых вариантах осуществления диапазон доз для взрослых людей обычно составляет от 0,005 мг до 10 г/сутки. Полипептиды, средства, связывающие TGF β , и композиции на их основе могут быть представлены в единичной лекарственной форме, например, в единице, которая эффективна при такой дозировке, или в виде нескольких единиц, например, единиц, содержащих от 5 мг до 500 мг, обычно от около 10 мг до 200 мг.
- 25 Единица дозировки может содержать, например, от 1 до 30 мг, от 1 до 40 мг, от 1 до 100 мг, от 1 до 300 мг, от 1 до 500 мг, от 2 до 500 мг, от 3 до 100 мг, от 5 до 20 мг, от 5 до 100 мг (например, 1 мг, 2 мг, 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг, 11 мг, 12 мг, 13 мг, 14 мг, 15 мг, 16 мг, 17 мг, 18 мг, 19 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 35 мг, 40 мг, 45 мг, 50 мг, 55 мг, 60 мг, 65 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 85 мг, 90 мг, 95 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг,
- 30 400 мг, 450 мг или 500 мг) полипептида, средства, связывающего TGF β , или композиции, описанных в данном документе.

[0222] Следует понимать, что эффективное количество полипептида или средства, связывающего TGF β , для терапевтического лечения заболевания или состояния варьируется в зависимости от способа введения, возраста, веса тела и общего состояния

здоровья субъекта. В конечном счете, лечащий врач или ветеринар определяет подходящее количество и режим дозирования. Следует понимать, что дозировка или количество полипептида или средства, связывающего TGF β , используемого отдельно или в комбинации с одним или несколькими активными соединениями для введения, зависят от конкретного случая и, обычно, должны быть адаптированы к индивидуальным обстоятельствам для достижения оптимального эффекта. Режимы дозирования и введения находятся в пределах компетенции опытного специалиста, и подходящие дозы зависят от ряда факторов, которые известны обычному квалифицированному врачу, ветеринару или исследователю (например, см. Wells et al. eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (2000); PDR *Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket *Pharmacopoeia* 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, Calif. (2000)). Например, режимы дозирования и введения зависят от природы и тяжести нарушения, подлежащего лечению, а также от пола, возраста, веса и индивидуальной восприимчивости человека или животного, подлежащего лечению, от эффективности и продолжительности действия используемых соединений, от того, является ли терапия острой, хронической или профилактической, и/или от того, вводятся ли другие активные соединения в дополнение к терапевтической(терапевтическим) молекуле(молекулам).

[0223] Введение соединений и композиций, предусмотренных в данном документе, может осуществляться с применением известных процедур, в дозировках и в течение периодов времени, эффективных для достижения требуемой цели. Режимы дозирования можно корректировать для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Например, можно вводить несколько разделенных доз в сутки или можно пропорционально снижать дозу в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. В некоторых вариантах осуществления соединение или композицию вводят в эффективной дозировке, достаточной для предупреждения или лечения фиброза у субъекта.

[0224] Нет конкретных ограничений по пути введения каждого из средств, связывающих TGF β , для применения в композициях, предусмотренных в данном документе. Полипептид, средство, связывающее TGF β , или композицию на их основе можно вводить с применением любого подходящего пути или способа, например, без ограничения посредством перорального, парентерального, внутривенного, интраперитонеального, внутримышечного, подкожного, сублингвального, местного или назального введения, путем ингаляции, путем инъекции, путем инфузии или посредством других таких путей, известных из уровня техники. В конкретном варианте осуществления полипептид, средство, связывающее TGF β , или композицию на их основе вводят путем инъекции или

инфузии, например и без ограничения, внутривенно, интраперитонеально, внутримышечно или подкожно.

[0225] В некоторых вариантах осуществления в соответствии со способами по настоящему изобретению один или несколько симптомов развития или прогрессирования TGFβ-ассоциированного заболевания или состояния у субъекта снижают на по меньшей мере 5%, например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%.

[0226] В некоторых вариантах осуществления в соответствии со способами по настоящему изобретению степень проявления симптомов фиброза у субъекта снижается. Например, полипептид, средство, связывающее TGFβ, или композиция способны снижать степень проявления фиброза, фиброзного рубцевания или утолщения кожи у субъекта на по меньшей мере 5%, например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%.

[0227] В некоторых вариантах осуществления в соответствии со способами по настоящему изобретению дифференцировку фибробластов в миофибробласты у субъекта подавляют, например, на по меньшей мере 5%, например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%.

[0228] В некоторых вариантах осуществления в соответствии со способами по настоящему изобретению рост опухоли и/или метастазирование у субъекта подавляют, например, на по меньшей мере 5%, например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%.

[0229] В некоторых вариантах осуществления в соответствии со способами по настоящему изобретению образование колоний гемопоэтических клеток и/или гемопоэз в костном мозге гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников (HSPC) в костном мозге субъекта повышают, например, на по меньшей мере 5%, например, по меньшей мере 10%,
5 по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%.

10 **[0230]** В некоторых вариантах осуществления в соответствии со способами по настоящему изобретению положительный ответ при фиброзе легких проявляется в виде последовательного замедления скорости снижения функции легких, измеряемой по форсированной жизненной емкости.

[0231] В некоторых вариантах осуществления в соответствии со способами по настоящему изобретению положительный ответ при фиброзе кожи, ассоциированном с системным склерозом, определяют по улучшению согласно модифицированной шкале оценки состояния кожи Роднана (MRSS). Например, показатель по MRSS может улучшаться у субъекта на по меньшей мере 5%, например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%,
15 по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%.

25 **[0232]** В некоторых вариантах осуществления при заболеваниях с недостаточностью костного мозга, в том числе при миелофиброзе, положительные ответы проявляются в улучшениях в отношении анемии (например, у пациентов, не зависящих от переливания крови, наблюдается повышение уровня гемоглобина, пациенты, зависящие от переливания крови, становятся независимыми от переливания крови).

30 **[0233]** В некоторых вариантах осуществления полипептид или средство, связывающее TGFβ, могут быть конъюгированы с терапевтическим фрагментом, как описано в данном документе. Требуемый терапевтический фрагмент может быть выбран по его способности предупреждать или лечить то же заболевание или состояние, на которое нацеливается полипептид или средство, связывающее TGFβ.

[0234] В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы предупреждения или лечения TGFβ-ассоциированного заболевания или состояния у субъекта посредством введения эффективного количества полипептида или средства, связывающего TGFβ, описанных в данном документе, с предупреждением или лечением таким образом TGFβ-ассоциированного заболевания или состояния у субъекта.

[0235] В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы подавления TGFβ у субъекта посредством введения эффективного количества полипептида или средства, связывающего TGFβ, описанных в данном документе, с подавлением таким образом TGFβ у субъекта. В некоторых таких вариантах осуществления предусмотрены способы подавления TGFβ3 у субъекта посредством введения эффективного количества полипептида или средства, связывающего TGFβ, описанных в данном документе, с подавлением таким образом TGFβ3 у субъекта. В некоторых таких вариантах осуществления предусмотрены способы подавления TGFβ3 и TGFβ1 у субъекта посредством введения эффективного количества полипептида или средства, связывающего TGFβ, описанных в данном документе, с подавлением таким образом TGFβ3 и TGFβ3 у субъекта.

[0236] В некоторых вариантах осуществления предусмотрены способы подавления дифференцировки фибробластов в миофибробласты *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*.

[0237] В некоторых вариантах осуществления терапевтических и профилактических способов лечения, предусмотренных в данном документе, полипептид или средство, связывающее TGFβ, вводят в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами терапии или терапевтическими средствами. Дополнительное средство терапии или терапевтическое средство можно вводить до, после или одновременно с введением полипептида, средства, связывающего TGFβ, или композиции, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство терапии или терапевтическое средство составляют вместе с полипептидом или средством, связывающим TGFβ, в одной композиции. В других вариантах осуществления дополнительное средство терапии или терапевтическое средство вводят отдельно. Примеры дополнительных средств терапии и терапевтических средств включают без ограничения противofiброзное средство; противораковое средство; другое средство, связывающее TGFβ, или ингибитор, например, антитело, фрагмент антитела, антигенсвязывающий фрагмент, растворимую ловушку лиганда TGFβ и т. п. В одном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой нинтеданиб (продаваемый под торговыми названиями Ofev® и Vargatef®). В одном варианте осуществления дополнительное

терапевтическое средство представляет собой пирфенидон. В одном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор контрольных точек иммунного ответа.

[0238] В качестве альтернативы, в некоторых вариантах осуществления полипептид или средство, связывающее TGF β , могут быть конъюгированы с выявляемым фрагментом или диагностическим фрагментом, который применим для отслеживания полипептида или средства, связывающего TGF β , или клеток или тканей, экспрессирующих TGF β . В некоторых таких вариантах осуществления предусмотрены способы диагностики TGF β -ассоциированного заболевания или состояния, включающие введение субъекту полипептида или средства, связывающего TGF β , по настоящему изобретению, конъюгированного с выявляемым фрагментом или диагностическим фрагментом, и выявление полипептида или средства, связывающего TGF β , с диагностированием таким образом заболевания или состояния, ассоциированного с TGF β (например, со сверхэкспрессией TGF β 1 и/или TGF β 3).

Наборы

[0239] В соответствии с настоящим изобретением полипептиды, средства, связывающие TGF β , и фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть собраны в наборы или фармацевтические системы для применения в лечении или предупреждении TGF β -ассоциированных заболеваний или состояний. Наборы или фармацевтические системы могут содержать контейнер (например, упаковку, коробку, картонную тару, флакон и т. п.), в котором в тесном контакте находятся один или несколько контейнеров, таких как флаконы, пробирки, ампулы, бутылки и т. п., которые содержат полипептид, средство, связывающее TGF β , или фармацевтическую композицию. Дополнительные компоненты набора могут включать кислоты, основания, буферные средства, неорганические соли, растворители, антиоксиданты, консерванты или хелаторы металлов. Дополнительные компоненты набора могут присутствовать в виде чистых композиций или в виде водных или органических растворов, которые содержат один или несколько дополнительных компонентов набора. Любой или все компоненты набора необязательно дополнительно содержат буферы. Наборы также могут содержать инструменты для введения, такие как иглы, шприцы и т. п. Набор можно использовать в соответствии со способами, описанными в данном документе, и он может содержать инструкции по применению в таких способах. Наборы также могут содержать инструкции по введению и применению полипептида, средства, связывающего TGF β , или фармацевтической композиции.

- [0240] Последовательности приведены в перечне последовательностей в таблице 2. В таблице 2 N-концевая IDR в эктодомене TGF β RII человека и последовательности, полученные из нее, показаны с подчеркиванием; С-концевая IDR в эктодомене TGF β RII человека и последовательности, полученные из нее, показаны с двойным подчеркиванием;
- 5 Gly-Ser линкерные области показаны курсивом и подчеркнуты, и мультимеризующие домены показаны курсивом и жирным шрифтом.

Таблица 2. Перечень последовательностей

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
1	hTGFβRII-ECD	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCI MEKKK PGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPD</u>	136
2	TGFβR-LBD	PQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCI MEKKK PGETFFMCSCSSDECNDNIIF	102
3	N-концевая IDR	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP</u>	24
4	C-концевая IDR	<u>SEEYNTSNPD</u>	10
5	TGFβ-связывающая область из T22d35-Fc-IgG1-v1(CC)	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCI MEKKK PGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPD</u> <u>IPPHVQKSVNNDM</u> <u>IVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI</u> TSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCI MEKKK PGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPD</u>	272
6	T22d35-Fc-IgG1-v1(CC)	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCI MEKKK PGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPD</u> <u>IPPHVQKSVNNDM</u>	496

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
	(Контроль)	<i>IVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCST TSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHD FILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNII FSEEYNTSNPDTHTCPPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG</i>	
7	Линкер	<u>SEEYNTSNPDIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u>	34
8	Линкер	<u>SEEYNTSNPDNNGAVKF</u>	18
9	Линкер	<u>SEEYNTSNPDNGAVKF</u>	16
10	Линкер	<u>SEEYNTSNPDNDMIVTDNNGAVKF</u>	24
11	Линкер	<u>SEEYNTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u>	30
12	Линкер	<u>SEEYNDMIVTDNNGAVKF</u>	18
13	Линкер	<u>SEEYPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u>	26
14	Линкер	<u>SEEYNTSNPDVTDNNGAVKF</u>	20
15	Линкер	<u>SEELYMIVTDNNGAVKF</u>	16
16	Линкер	<u>SEEYNTSNPDPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u>	32

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
17	Линкер	<u>GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS</u>	30
18	Линкер	<u>SEEYNTGGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGG</u>	30
19	Линкер	<u>SEEYNTSNPDVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u>	30
20	Линкер	<u>GGGGS GGGGS GGGGS G</u>	16
21	Линкер	<u>GGGGS GGGGS GGGGS GGGG</u>	18
22	Линкер	<u>SEEYDMIVTDNNGAVKF</u>	17
23	Линкер	<u>SEEYNNDMIVTDNNGAVKF</u>	19
24	Линкер	<u>GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGG</u>	34
25	Линкер	<u>SEEYNTSNPDGGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGG</u>	34
26	Линкер	<u>SEEYNTSNPDVNNDMIVTDNNGAVKF</u>	26
27	TGFβ-связывающая область – белок 61	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPD</u> DDNNGAVKFPQLC KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPD</u> NGAV <u>KF</u>	262

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
28	TGFβ-связывающая область – белок 93	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDNDMIVTDNNGAV</u> <u>KFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPD</u> <u>NGAVKF</u>	268
29	TGFβ-связывающая область – белок 96	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPD</u> DNNGAVKFPQLC KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVAVW RKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPD</u> NGAV <u>KF</u>	262
30	TGFβ-связывающая область – белок 97	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDNDMIVTDNNGAV</u> <u>KFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPD</u> <u>D</u>	262
31	TGFβ-связывающая область – белок 98	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFF	288

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
	щя область – белок 99	MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u> PQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNC SITSICEKPQEVCVA VWRKNDENITLETVCHDPKL PYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u>	
32	TGFβ- связываю щая область – белок 101	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u> PQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNC SITSICEKPQEVCVA VWRKNDENITLETVCHDPKL PYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEYYNDMIVTDNNGAVKF</u> PQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNC SITSICEKPQEVCVA VWRKNDENITLETVCHDPKL PYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u>	276
33	TGFβ- связываю щая область – белок 106	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u> PQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNC SITSICEKPQEVCVA VWRKNDENITLETVCHDPKL PYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEYYPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u> PQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNC SITSICEKPQEVCVA VWRKNDENITLETVCHDPKL PYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEYYPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u>	280
34	TGFβ- связываю щая область – белок 107	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u> PQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNC SITSICEKPQEVCVA VWRKNDENITLETVCHDPKL PYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEYYNTSNPDDNNGAVKF</u> PQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNC SITSICEKPQEVCVA VWRKNDENITLETVCHDPKL PYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEYYNTSNPDDNNGAVKF</u>	256

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED AASPKCIMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPD</u>	
35	TGFβ- связываю щая область – белок 108	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILED AASPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDNGAVKFPQLCKFC</u> DVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKN DENITLETVCHDPKLPYHDFILED AASPKCIMKEKKKP GETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDNGAVKF</u>	260
36	TGFβ- связываю щая область – белок 109	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILED AASPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDVTDNNGAVKFPQ</u> LCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCA VWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED AASPKCIM KEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDNG</u> <u>AVKF</u>	264
37	TGFβ- связываю щая область – белок 112	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILED AASPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNDMIVTDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED AASPKCIMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYMIVTDNNGA</u> <u>VKF</u>	262

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
38	TGFβ-связывающая область – белок 113	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDPHVQKSVNNDMI</u> <u>VTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSI TSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHD FILEDAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNII F <u>SEEYNTSNPDPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u>	292
39	TGFβ-связывающая область – белок 115	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDPHVQKSVNNDMI</u> <u>VTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSI TSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHD FILEDAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNII F <u>SEEYNTSNPDPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u>	292
40	TGFβ-связывающая область – белок 116	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDPHVQKSVNNDMI</u> <u>VTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSI TSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHD FILEDAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNII F <u>SEEYNTSNPDIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u>	294
41	TGFβ-связывающая область – белок 117	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFF	276

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
	щая область – белок 128	MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNDMIVTDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTIPPHVQKS</u> <u>VNNDMIVTDNNGAVKF</u>	
42	TGFβ-связывающая область – белок 112	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNDMIVTDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>GGGGSGGGSGGG</u> <u>GSGGGSGGGSGGGG</u>	276
43	TGFβ-связывающая область – белок 130	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNDMIVTDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTGGGGSGG</u> <u>GGSGGGSGGGSGGGG</u>	276
44	TGFβ-связывающая область – белок 131	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNDMIVTDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKE	276

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDVQKS</u> <u>VNNDMIVTDNNGAVKF</u>	
45	TGFβ- связываю щая область – белок 132	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDVQKS</u> <u>VNNDMIVTDNNGAVKF</u>	276
46	TGFβ- связываю щая область – белок 133	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTIPPHVQKS</u> <u>VNNDMIVTDNNGAVKF</u>	276
47	TGFβ- связываю щая область – белок 134	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>GGGGSGGGSGGG</u> <u>GSG</u>	262

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
48	TGFβ-связывающая область – белок 135	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>GGGGSGGGSGGGSGGGPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDNGAV</u> <u>KF</u>	262
49	Область hIgG1Fc(C)	<i>THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT</i> <i>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ</i> <i>YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI</i> <i>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</i> <i>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY</i> <i>SKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL</i> <i>SPG</i>	224
50	Область hIgG4Fc	<i>GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT</i> <i>CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ</i> <i>FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI</i> <i>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV</i> <i>KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL</i> <i>YSRLTVDKSRWQEGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS</i> <i>LSLG</i>	224
51	hIgG1Fc	<i>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS</i> <i>HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV</i> <i>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</i> <i>GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI</i>	217

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		<i>AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i>	
52	Вариант hIgG1Fc	<i>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	216
53	Вариант hIgG1Fc	<i>PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	220
54	Вариант hIgG1Fc	<i>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	226
55	Вариант hIgG1Fc	<i>EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	231
56	Вариант hIgG1Fc	<i>EPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	231

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		<i>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	
57	hIgG2Fc	<i>APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIS VEWESNGQPENNYKTTTPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i>	216
58	Вариант hIgG2Fc	<i>VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i>	223
59	Вариант hIgG2Fc	<i>ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIS VEWESNGQPENNYKTTTPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i>	228
60	Вариант hIgG2Fc	<i>ERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIS VEWESNGQPENNYKTTTPMLDS DGS</i>	227

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		<i>FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	
61	Вариант hIgG2Fc	<i>ERKSSVESPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG</i>	227
62	Вариант hIgG2Fc	<i>ERKSSVESPPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG</i>	227
63	Вариант hIgG2Fc	<i>APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIS VEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	215
64	Вариант hIgG2Fc	<i>PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIS VEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	219
65	Вариант hIgG2Fc	<i>VECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN</i>	222

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		<i>STFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDISVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS PG</i>	
66	hIgG3Fc	<i>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK TGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSGDSFFLYSKLTVD KSRWQQGNIFSCSVMEALHNRFQKSLSLSPGK</i>	217
67	Вариант hIgG3Fc	<i>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK TGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSGDSFFLYSKLTVD KSRWQQGNIFSCSVMEALHNRFQKSLSLSPG</i>	216
68	Вариант hIgG3Fc	<i>PRCPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST FRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSGDSFFLYSKL TVDKSRWQQGNIFSCSVMEALHNRFQKSLSLSPG</i>	220
69	Вариант hIgG3Fc	<i>DTPPCPRCPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMEALHNRFQKS LSLSPG</i>	226

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
70	Вариант hIgG3Fc	<i>EPKSSDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSV MHEALHNRF TQKSLSLSPG</i>	231
71	Вариант hIgG3Fc	<i>EPKSSDTPPPSPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSV MHEALHNRF TQKSLSLSPG</i>	231
72	Вариант hIgG3Fc	<i>EPKSSDTPPPSPRSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSV MHEALHNRF TQKSLSLSPG</i>	231
73	hIgG4Fc	<i>APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK</i>	217
74	Вариант hIgG4Fc	<i>APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA</i>	216

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		<i>KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGL</i>	
75	Вариант hIgG4Fc	<i>PSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGL</i>	220
76	Вариант hIgG4Fc	<i>ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQK SLSLGL</i>	228
77	Вариант hIgG4Fc	<i>ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQK SLSLGL</i>	228
78	Вариант hIgG4Fc	<i>ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQK SLSLGL</i>	228

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
79	Вариант hIgG4Fc	<i>ESKYGPPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQK SLSLSLG</i>	228
80	Вариант hIgG4Fc	<i>ESKYGPPSPSSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQK SLSLSLG</i>	228
81	Белок 61	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPK CIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPK CIMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPD</u> NGAV <u>KFGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE</u> <i>VTCTVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKS LSLSLG</i>	486
105	Белок 70	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL	486

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETTF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDNDMIVTDNNGAV</u> <u>KFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV</u> CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPK CIMKEKKKPGETTFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNP</u> <u>DGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE</u> <u>VT</u> CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSLG	
82	Белок 93	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETTF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDNDMIVTDNNGAV</u> <u>KFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV</u> CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPK CIMKEKKKPGETTFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNP</u> <u>DNGAVKF</u> <u>GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL</u> <u>MISRTPEVT</u> CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLG	492
83	Белок 94	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETTF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDNDMIVTDNNGAV</u>	500

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		<u>KFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV</u> CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPK CIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF<u>SEEYNTSNP</u> <u>DNDMIVTDNNGAVKFGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF</u> <i>PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV</i> <i>DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN</i> <i>GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP</i> <i>SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN</i> <i>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS</i> <i>VMHEALHNHYTQKSLSLGL</i>	
84	Белок 96	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPK CIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF<u>SEEYNTSNPDNDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVAVW RKNNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPK CIMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF<u>SEEYNTSNPDNGAV</u> <u>KFTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE</u> <i>VTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE</i> <i>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP</i> <i>APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC</i> <i>LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSF</i> <i>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS</i> <i>LSLSPG</i>	486
85	Белок 97	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPK CIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF<u>SEEYNTSNPDNDMIVTDNNGAV</u> <u>KFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV</u> CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPK	486

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		CIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF<u>SEEYNTSNP</u> <u>DTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE</u> VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	
86	Белок 99	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF<u>SEEYNTIPPHVQKSVNNDMIVTD</u> <u>NNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u>CDNQKSCMSNCSITSIC EKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILE DAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF<u>SEE</u> <u>YNTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFGPPCPPCPA</u> <u>PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ</u> <u>EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS</u> <u>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG</u> <u>QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA</u> <u>VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS</u> <u>RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG</u>	512
87	Белок 101	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF<u>SEEYNDMIVTDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF<u>SEEYNTIPPHVQKS</u> <u>VNNDMIVTDNNGAVKFTHTCPPCPAPELLGGPSVFL</u>	500

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		<i>FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	
88	Белок 106	<i>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	504
89	Белок 107	<i>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCKIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY</i>	480

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		<i><u>RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u></i>	
90	Белок 108	<i><u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDNGAVKFTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK</u></i> <i><u>TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u></i>	484
91	Белок 109	<i><u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDNGAVKFTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA</u></i>	488

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		<i>LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	
92	Белок 112	<i><u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u>CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF<u>SEEYNDMIVTDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWR KNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF<u>SEEYMIVTDNNGA</u> <u>VKFTHTCP</u>PCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG</i>	486
93	Белок 113	<i><u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u>CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF<u>SEEYNTSNPDPHVQKSVNNDMI</u> <u>VTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u>CDNQKSCMSNCSI TSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHD FILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNII F<u>SEEYNTSNPDPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF</u><u>TH</u> <u>CP</u>PCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST</i>	516

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		<i>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	
94	Белок 115	<i><u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF<u>SEEYNTSNPD</u>PHVQKSVNNDMI <u>VTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u>CDNQKSCMSNCSI TSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHD FILEDAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNII F<u>SEEYNTSNPD</u>PHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF<i>GPP</i> <i>CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</i> <i>VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN</i> <i>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK</i> <i>TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG</i> <i>FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS</i> <i>RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS</i> <i>LG</i></i>	516
95	Белок 116	<i><u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF<u>SEEYNTSNPD</u>PHVQKSVNNDMI <u>VTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u>CDNQKSCMSNCSI TSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHD FILEDAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNII F<u>SEEYNTSNPD</u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF<i>TH</i> <i>TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</i></i>	518

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		<i>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	
96	Белок 128	<i><u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u>CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF<u>SEEYNDMIVTDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF<u>SEEYNTIPPHVQKS VNNDMIVTDNNGAVKFGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSLG</u></i>	500
97	Белок 129	<i><u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u>CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF<u>SEEYNDMIVTDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF<u>GGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSTHTCPPCPAPELLGGPSVFL</u></i>	500

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		<i>FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	
98	Белок 130	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNDMIVTDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTGGGGSGG</u> <u>GGSGGGSGGGSGGGG</u> <u>THTCPPCPAPELLGGPSVF</u> <i>LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	500
99	Белок 131	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNDMIVTDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDVQKS</u> <u>VNNDMIVTDNNGAVKF</u> <u>THTCPPCPAPELLGGPSVFL</u>	500

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		<i>FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	
100	Белок 132	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDVQKS</u> <u>VNNDMIVTDNNGAVKE</u> <i>THTCPPCPAPELLGGPSVFL</i> <i>FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY</i> <i>VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL</i> <i>NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	500
101	Белок 133	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTIPPHVQKS</u> <u>VNNDMIVTDNNGAVKE</u> <i>THTCPPCPAPELLGGPSVFL</i>	500

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		<i>FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>	
102	Белок 134	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDDNNGAVKFPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>GGGGSGGGGSGGG</u> <u>SGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE</u> <u>VT</u> TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	486
103	Белок 135	<u>IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST</u> CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIF <u>GGGGSGGGGSGGGGSGGGPQLC</u> KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKE KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF <u>SEEYNTSNPDNGAV</u> <u>KFTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE</u>	486

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		<i>VTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG</i>	
104	Сигнальный пептид	MDWTWRILFLVAAATGTHA	19
106	cDNA, кодирующая белок 61	ATTCCTCCACACGTGCAGAAATCCGTGAACAACGA CATGATCGTGACCGACAACAATGGCGCCGTGAAGT TCCCTCAGCTGTGCAAGTTCTGCGACGTGCGGTTCT CTACCTGCGACAACCAGAAATCCTGCATGTCCAAC TGCTCCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGA AGTGTGCGTCGCCGTCTGGCGGAAGAACGACGAGA ACATCACCTGGAACCGTGTGCCACGATCCTAAG CTGCCCTACCACGACTTCATCCTGGAAGATGCCGC CTCTCCTAAGTGCATCATGAAGGAAAAGAAGAAGC CCGGCGAGACTTTCTTCATGTGCAGCTGCTCCTCCG ACGAGTGCAACGACAACATCATCTTCTCCGAAGAG TACAACACCAGCAATCCCGACGATAACAACGGGGC TGTGAAATTCCACAGCTCTGTAAATTTTGTGATGT GCGGTTTCAGCACCTGTGACAATCAAAAGTCTTGCA TGAGCAACTGCAGCATCACCAGCATCTGTGAAAAA CCTCAAGAAGTCTGCGTTGCAGTTTGGCGCAAAAA TGATGAGAATATCACTCGAGACAGTGTGTCATG ACCCAAGCTGCCTTATCATGATTTTCATCTTGGAGG ACGCTGCTAGCCCCAAGTGTATTATGAAGGAAAAA AAGAAACCTGGGGAAACCTTCTTTATGTGCTCCTG CAGCAGCGACGAGTGTAATGATAACATTATTTTCA	n/a

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количес тво аминок ислот
		GTGAAGAGTATAATACCTCCAATCCTGACAACGGC GCTGTCAAGTTTGGGCCCCCTTGTCTCCTTGTCCA GCTCCTGAATTTCTCGGCGGACCCTCCGTGTTCTG TTTCTCCTCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCT CGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGT GTCCCAAGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGT ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGAC CAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACA GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAT TGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTC CAACAAGGGCCTGCCTTCCAGCATCGAAAAGACCA TCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAG GTGTACACACTGCCTCCAAGCCAAGAGGAAATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGG GCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAG AGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCAC ACCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTTCT GTACTCCCGCCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGC AAGAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCAC GAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCT GTCTCTAAGCTTAGGCTGA	
107	cDNA, кодирующ ая белок 96	ATCCCCCCTCATGTGCAGAAGTCCGTGAACAATGA CATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAGT TTCCACAGCTGTGCAAGTTCTGTGACGTGAGGTTTA GCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGAGCAAC TGTCTATCACATCCATCTGCGAGAAGCCACAGGA GGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAGAACGACGAG AATATCACCTGGAGACAGTGTGCCACGATCCAAA GCTGCCCTACCATGACTTCATCCTGGAGGATGCTGC	n/a

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количес тво аминок ислот
		CTCTCCTAAGTGTATCATGAAGGAGAAGAAGAAGC CAGGCGAGACCTTCTTTATGTGCTCCTGTTCCAGCG ACGAGTGCAACGATAATATCATCTTCAGCGAGGAG TATAACACATCTAATCCCGACGATAACAATGGCGC TGTGAAGTTTCCTCAGCTGTGCAAATTTTGTGACGT GAGATTTTCTACCTGTGATAATCAGAAGAGCTGCA TGTCTAACTGTTCCATCACATCTATTTGTGAAAAAC CTCAGGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGAGAAAAAAT GATGAAAACATCACCTGGAAACAGTGTGCCACGA TCCTAAGCTGCCATATCACGACTTCATCCTGGAAG ACGCTGCCAGCCCAAAATGCATTATGAAAGAGAAG AAGAAGCCCGGTGAGACCTTCTTTATGTGCAGCTG TTCTTCTGATGAATGTAATGACAATATCATCTTCTC CGAGGAGTATAACACAAGCAATCCTGACAACGGCG CTGTGAAGTTTACCCACACATGCCCACCATGTCCTG CTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCATCCGTGTTCTG TTTCCTCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAG CAGGACCCCCGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACG TGTCTCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTTAATTGG TACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAACGCTAAGAC CAAGCCAAGGGAGGAGCAGTACAACCTCTACCTATC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCATCAGGAT TGGCTGAATGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTC CAACAAGGCTCTGCCCCGCCCTATCGAGAAGACCA TCAGCAAGGCTAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAG GTGTACACACTGCCCCCTTCTCGCGACGAGCTGAC CAAGAATCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGG GCTTCTATCCTTCCGATATCGCTGTGGAGTGGGAGA GCAACGGACAGCCAGAGAACAATTACAAGACCAC ACCACCCGTGCTGGACTCTGATGGCTCCTTCTTTCT	

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		GTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCTAGGTGGC AGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGTTCTGTGATGCAC GAGGCCCTGCACAACCATTACACACAGAAGTCCCT GAGCCTGTCTCCTGGCTGA	
108	cDNA, кодирующая белок 101	ATCCCCCTCATGTGCAGAAGTCCGTGAACAATGA CATGATCGTGACAGATAACAATGGCGCCGTGAAGT TTCCCCAGCTGTGCAAGTTCTGTGACGTGAGGTTTA GCACCTGCGATAACCAGAAGTCCTGCATGAGCAAT TGTTCTATCACATCCATCTGCGAGAAGCCTCAGGA GGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAGAACGACGAG AATATCACCTTGAGACAGTGTGCCACGATCCCAA GCTGCCTTACCATGACTTCATCCTGGAGGATGCTGC CTCTCCAAAGTGTATCATGAAGGAGAAGAAGAAGC CCGGCGAGACCTTCTTTATGTGCTCCTGTTCCAGCG ACGAGTGCAACGATAATATCATCTTCAGCGAGGAG TATAACGATATGATTGTACAGATAACAATGGCGC TGTGAAGTTTCCACAGCTGTGCAAATTTTGTGACGT GAGATTTTCCACCTGTGATAACCAGAAGAGCTGCA TGTCTAATTGTTCCATCACAAGCATCTGCGAGAAG CCACAGGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGAGAAAAA ATGATGAAAACATCACCTGGAAACAGTGTGCCAC GATCCAAAGCTGCCCTATCACGACTTCATCCTGGA AGACGCTGCCAGCCCTAAATGCATTATGAAAGAGA AGAAGAAGCCAGGTGAGACCTTCTTTATGTGCAGC TGTTCTTCTGATGAATGTAATGACAATATCATCTTC TCCGAGGAGTATAACACCATCCCTCCACACGTGCA GAAGTCTGTGAATAACGATATGATTGTGACCGACA ATAACGGTGCTGTGAAGTTTACCCATACATGCCCA CCTTGTCCAGCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCATC	n/a

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количес тво аминок ислот
		CGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAGGACACCCT GATGATCAGCAGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGG TGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAGGTGAAG TTTAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAA TGCTAAGACCAAGCCTAGGGAGGAGCAGTACAACCT CTACCTATCGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGC AAGGTGTCCAATAAGGCTCTGCCTGCCCCAATTGA GAAGACCATCAGCAAGGCTAAGGGCCAGCCTAGA GAGCCACAGGTGTACACACTGCCTCCATCTCGCGA CGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGTC TGGTGAAGGGCTTCTATCCCTCCGATATCGCTGTGG AGTGGGAGAGCAACGGACAGCCTGAGAACAATTA CAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCTGATGGCT CCTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGATAAGT CTAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTAGCTGTTCT GTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATTACACACA GAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCAGGCTGA	
109	cDNA, кодирующ ая белок 128	ATCCCCCCTCATGTGCAGAAGAGCGTCAATAACGA CATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAGT TCCCACAGCTGTGCAAGTTCTGTGACGTGAGGTTTA GCACCTGCGATAATCAGAAGTCTTGCATGTCCAAC TGTAGCATCACATCTATCTGCGAGAAGCCACAGGA GGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAGAACGACGAG AATATCACCTTGAGACAGTGTGCCACGATCCAAA GCTGCCCTACCATGACTTTATCCTGGAGGATGCCGC TAGCCCTAAGTGTATCATGAAGGAGAAGAAGAAGC CAGGCGAGACATTCTTTATGTGCTCTTGTTCCAGCG ACGAGTGCAACGATAATATCATCTTCTCCGAGGAG	n/a

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количес тво аминок ислот
		TATAACGATATGATCGTGACAGACAATAACGGCGC CGTGAAGTTTCCTCAGCTGTGCAAATTTTGTGACGT GAGATTTTCTACCTGTGATAATCAGAAGTCCTGCAT GAGCAACTGTTCTATCACATCCATTTGTGAAAAAC CTCAGGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGAGAAAGAAT GACGAGAACATCACCTGGAGACAGTGTGCCATGA TCCTAAGCTGCCATAACCATGACTTCATCCTGGAAG ACGCCGCTTCCCCCAAATGCATTATGAAAGAGAAG AAGAAGCCTGGCGAGACATTCTTCATGTGCAGCTG TTCTTCTGATGAGTGCAACGATAACATCATCTTTTC TGAGGAGTACAACACCATCCCCCTCACGTGCAGA AGTCTGTGAACAATGACATGATCGTGACAGATAAC AATGGAGCTGTGAAGTTCGGGCCCCCATGCCCTCC ATGTCCAGCTCCTGAGTTTCTGGGCGGCCCATCCGT GTTCTGTTTCCCCCTAAGCCCAAGGACACCCTGAT GATCTCCAGGACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCAGGAGGACCCCGAGGTGCAGTTC AATTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAACGC CAAGACAAAGCCTAGAGAGGAGCAGTTTAATAGC ACCTACCGCGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCAT CAGGATTGGCTGAATGGCAAGGAGTATAAGTGCAA GGTGTCTAACAAGGGCCTGCCAAGCTCTATCGAGA AGACCATCTCCAAGGCTAAGGGACAGCCAAGGGA GCCTCAGGTGTACACACTGCCACCCAGCCAGGAGG AGATGACCAAGAATCAGGTGTCTCTGACATGTCTG GTGAAGGGCTTCTATCCATCTGACATCGCTGTGGA GTGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAATTACA AGACCACACCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCTCT TTCTTTCTGTATTCCAGGCTGACCGTGGATAAGAGC CGGTGGCAGGAGGGCAACGTGTTTTCTGTAGCGT	

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность	Количество аминокислот
		GATGCACGAAGCACTGCACAACCACTACACTCAGAAATCACTGTCACTGTCCCTGGGCTAA	
110	ДНК, кодирующая последовательность Kozak (выделена курсивом), и сигнальный пептид	<i>GCCACCATGGACTGGACCTGGAGAATCCTGTTCTTGGTGGCTGCTGCTACCGGAACACACGCT</i>	n/a
111	ДНК, кодирующая последовательность Kozak (выделена курсивом), и сигнальный пептид	<i>GCCACCATGGACTGGACTTGGAGAATCCTGTTCTTGTCGCGCCGCGCAACTGGTACTCATGCT</i>	n/a

n/a: не применимо.

ПРИМЕРЫ

[0241] Настоящее изобретение станет более понятным при рассмотрении следующих примеров, которые приведены для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие его объем каким-либо образом.

[0242] Если не определено иное, или контекст явно не диктует иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в той области, к которой относится настоящее изобретение. Следует учитывать, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы при осуществлении на практике или тестировании настоящего изобретения.

Пример 1. Определение характеристик и структурный анализ известных средств, связывающих TGFβ

[0243] Эктодомен TGFβRII (SEQ ID NO: 1) содержит структурированную часть, которая представляет собой лиганд-связывающий домен (SEQ ID NO: 2), фланкированный как на N-, так и на C-конце внутренне неупорядоченными областями (IDR; SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно).

[0244] Ранее были описаны слитые молекулы эктодомена TGFβRII (WO2017/037634, WO2018/158727). Такие слитые молекулы содержат два структурированных лиганд-связывающих домена (SEQ ID NO: 2), связанных вместе тандемно (голова к хвосту) линкерами, полученными из IDR и их вариантов. Как сообщается в WO2018/158727, такие полипептидные конструкции демонстрировали в по меньшей мере 600 раз более высокую эффективность подавления, чем сходные конструкции, имеющие только один лиганд-связывающий домен (см. WO2018/158727, страница 2, строки 27-31, где говорится: "[конструкция], в которой первая область содержит дублет (TβRII-ECD)-(TβRIIECD), связанный на своем C-конце с константным доменом антитела, подавляет активность TGFβ с в по меньшей мере 600 раз большей эффективностью, чем аналогичная конструкция, имеющая один TβRII-ECD, связанный на своем C-конце с константным доменом антитела (т. е. где второй ECD отсутствует, что также называется в данном документе синглетом)".

Далее такие "дублетные" полипептидные конструкции (называемые "T22d35-Fc") могут связывать и нейтрализовать в различной степени все три изоформы TGFβ (то есть TGFβ1, β2 и β3), хотя TGFβ2 обычно нейтрализуется в гораздо меньшей степени, чем TGFβ1 и TGFβ3. Например, для варианта T22d35-Fc-IgG1-v1 (CC) эффективность нейтрализации в отношении TGFβ1 и TGFβ3 была заявлена как очень сходная, тогда как эта эффективность была значительно ниже в отношении TGFβ2 (IC50 = 17,33 нМ в отношении TGFβ2 по сравнению с 0,003327 нМ и 0,003251 нМ соответственно в отношении TGFβ1 и TGFβ3; см. WO2018/158727, страница 26, строки 24-27). Об аналогичных результатах сообщалось и для других вариантов.

[0245] Для дальнейшего изучения свойств связывания и нейтрализации таких средств, связывающих TGF β , авторы настоящего изобретения выбрали иллюстративную слитую молекулу "T22d35-Fc-IgG1-v1 (CC)" для дополнительного исследования. В этой слитой молекуле (SEQ ID NO: 6 в данном документе; SEQ ID NO: 14 в WO2018/158727) линкер между двумя структурированными лиганд-связывающими доменами представляет собой продукт слияния С-концевой и N-концевой IDR в таком порядке (полная последовательность линкера показана под SEQ ID NO: 7), а линкер между вторым лиганд-связывающим доменом и мультимеризующим доменом представляет собой С-концевую IDR (SEQ ID NO: 4) T β RII-ECD. В этой слитой молекуле мультимеризующий домен представляет собой область hIgG1Fc(CC) (SEQ ID NO: 49).

[0246] Сначала авторы настоящего изобретения осуществили более подробное определение характеристик эффективности подавления (IC₅₀) продукта слияния T22d35-Fc-IgG1-v1 (CC) в отношении различных изоформ TGF β , в частности TGF β 1 и TGF β 3, с применением анализа высвобождения IL-11 из A549. Анализ высвобождения IL-11 из A549 проводили в основном так, как описано (WO2018/158727) и более подробно описано в примере 2 ниже.

[0247] Для более подробного анализа эффективности подавления и получения значений IC₅₀ с большей точностью авторы настоящего изобретения протестировали больше концентраций TGF β , близких к IC₅₀ (больше точек на кривой), в анализе высвобождения IL-11 из A549. Иллюстративные результаты показаны на фиг. 4А и 4В, а результаты, усредненные из 6 экспериментов, приведены в таблице 3. Авторы настоящего изобретения определили среднее значение IC₅₀ как составляющее 2,89 пМ $\pm$ 0,16 в отношении TGF β 1, что не противоречит предыдущим сообщениям (WO2018/158727). Однако в отношении TGF β 3 среднее значение IC₅₀ составляло 8,64 пМ $\pm$ 0,43, что значительно выше, чем ожидалось (т. е. эффективность подавления является более низкой, чем ожидалось). Результаты указывают на в примерно 3-3,5 раза более высокую эффективность подавления в отношении TGF β 1 по сравнению с TGF β 3, что указывает на преимущественное подавление или нейтрализацию лиганда TGF β 1 продуктом слияния T22d35-Fc-IgG1-v1 (CC). Следует отметить, что эффективность подавления в отношении TGF β 2 была значительно ниже, чем в отношении TGF β 1 и TGF β 3, как сообщалось ранее (WO2018/158727; фиг. 11).

Таблица 3. Значения IC₅₀ для T22d35-Fc-IgG1-v1 (CC) (SEQ ID NO: 6).

TGF β 1	TGF β 3	Соотношение IC ₅₀ TGF β 3: TGF β 1	n (число)
---------------	---------------	--	--------------

						повторностей)
Средняя IC ₅₀ (нМ)	SEM	Средняя IC ₅₀ (нМ)	SEM	Среднее соотношение	SEM	25
2,89	0,16	8,64	0,43	3,20	0,24	

SEM: стандартная ошибка среднего

[0248] Эти результаты согласуются с заявлениями в WO2018/158727, которые предполагают большее подавление или нейтрализацию TGFβ1 по сравнению с TGFβ3 (см., например, страницу 3, строки 26-28 WO2018/158727, где говорится, что "Fc-дуплет (T22d35-Fc) демонстрирует усиление эффективности, при котором она является в по меньшей мере 970 раз более высокой в отношении TGFβ1 и в по меньшей мере 240 раз более высокой в отношении TGFβ3 по сравнению с ECD-дуплетом, не слитым с Fc").

[0249] Для того чтобы лучше понять потенциальный механизм, лежащий в основе преимущественного подавления лиганда TGFβ1 по сравнению с лигандом TGFβ3 ранее описанными слитыми конструкциями, авторы настоящего изобретения затем проводили структурное сравнение двух изоформ лиганда. Следует отметить, что лиганд-связывающие домены ранее описанных слитых конструкций взаимодействуют с практически идентичными эпитопами на лигандах TGFβ1 и TGFβ3 (Baardsnes, J. et al., 2009). Соответственно, дифференциальная аффинность в отношении мономеров в составе димеров TGFβ полностью не объясняет преимущественное подавление лиганда TGFβ1. На фиг. 2A показано перекрывание мономерных структур TGFβ1 (синий) и TGFβ3 (зеленый). Перекрывание димеров TGFβ1 и TGFβ3, наблюдаемое в структурах с ID в Protein Data Bank (PDB) 3KFD и 1KTZ соответственно, показано на фиг. 2B ID (ID в Protein Data Bank (PDB) для структур представляют собой 3KFD и 1KTZ соответственно). Видно, что, хотя TGFβ1 и TGFβ3 очень похожи на уровне аминокислотной последовательности, и оба мономера имеют сходную укладку с удлиненными цистеиновыми узлами (фиг. 2A), расположение двух мономеров в пределах биологически активных димеров значительно отличается при сравнении структур двух изоформ. Очевидно, что каждая изоформа лиганда имеет определенный диапазон угла димеризации. Диапазон угла димеризации влияет на общую форму, пространственную протяженность и компактность димерной молекулы. Это различие в форме димеров TGFβ1 и TGFβ3 может приводить к преимущественной нейтрализации TGFβ1 по сравнению с TGFβ3 ранее описанными слитыми конструкциями, т. е. конкретное расположение лиганд-связывающих доменов в слитой конструкции может приводить к преимущественным взаимодействиям (преимущественной авидности) с лигандом TGFβ1 ввиду того, что димер этой изоформы имеет отличающуюся форму.

[0250] На фиг. 2С показана иллюстративная модель слитой конструкции (T22d35-Fc-IgG1-v1(CC), SEQ ID NO: 6), связанной с лигандом TGF β , в которой показан второй лиганд-связывающий домен, второй линкер и Fc-области. Эта модель показана в данном документе для иллюстрации эффектов короткого (10 аминокислот) второго линкера. Зеленая линия

5 показывает, что длина линкера/спейсера укорочена на по меньшей мере 25 ангстремов для обеспечения связывания лиганда между присоединенными связывающими доменами. В частности, длина 10-аминокислотного линкера в T22d35-Fc-IgG1-v1(CC) составляет ~35 Å даже в удлиненной конформации, что короче оптимальной длины линкера на приблизительно ~20 Å, как рассчитано с применением молекулярного моделирования.

10 Таким образом, в этой слитой конструкции вторые лиганд-связывающие домены стерически ограничены в отношении размещения димера TGF β .

[0251] Следует отметить, что структурированный лиганд-связывающий домен представляет собой часть слитых конструкций, которая участвует в образовании области взаимодействия с лигандами TGF β , например, TGF β 1 и TGF β 3, и что линкерные области не

15 взаимодействуют непосредственно со связанным лигандом. Однако, с учетом различий в димерной структуре TGF β 1 и TGF β 3 и конформационных ограничений, накладываемых линкерными областями, анализ авторов настоящего изобретения позволил предположить, что модификация линкерных областей может влиять на связывающие свойства средства, связывающего TGF β , таким образом, что изменяется его специфичность связывания

20 лиганда. В частности, укорочение первой линкерной области между лиганд-связывающими доменами и удлинение второй линкерной области между вторым лиганд-связывающим доменом и мультимеризующим доменом может ослабить стерические и конформационные ограничения таким образом, что изменяются значения относительной эффективности подавления в отношении лигандов TGF β 1 и TGF β 3.

25 **Пример 2. Разработка и определение характеристик средств, связывающих TGF β , с измененной специфичностью в отношении изоформ**

[0252] Авторы настоящего изобретения создавали молекулы с различными последовательностями и длинами линкеров, чтобы выяснить, может ли модификация линкеров по-разному влиять на специфичность в отношении изоформ и эффективность

30 подавления лигандов TGF β , в частности TGF β 1 и TGF β 3. Исходя из структурного анализа, авторы настоящего изобретения сосредоточились на молекулах с укороченными линкерными частями между двумя лиганд-связывающими доменами (первая линкерная часть) и удлиненными линкерными частями между вторым лиганд-связывающим доменом и мультимеризующим доменом (вторая линкерная часть). Цель авторов настоящего

изобретения заключалась в разработке средств, связывающих TGFβ, с меньшим преимущественным подавлением TGFβ1 по сравнению с TGFβ3 (т. е. с более низким соотношением IC₅₀ в отношении TGFβ3:TGFβ1) с сохранением при этом хорошей эффективности подавления в целом для создания связывающих средств с благоприятными терапевтическими свойствами при конкретных показаниях по заболеваниям.

[0253] Разработали серию средств, связывающих TGFβ, с линкерами различной длины и последовательности. Структуры иллюстративных слитых белков обобщенно представлены в таблице 4. Последовательности приведены в таблице 2.

[0254] Тестируемые связывающие средства были гомодимерами, при этом каждый полипептид в гомодимере содержал N-концевую область, содержащую N-концевую IDR эктодомена TGFβRII (SEQ ID NO: 3); два лиганд-связывающих домена рецептора TGFβ типа II (TGFβRII) (SEQ ID NO: 2); 18-аминокислотную первую линкерную часть между двумя лиганд-связывающими доменами (SEQ ID NO: 8 или 12); 10-, 16- или 30-аминокислотную вторую линкерную часть между вторым лиганд-связывающим доменом и мультимеризующим доменом (SEQ ID NO: 4, 9, 11 или 15) и мультимеризующий домен hIgG1Fc(CC) (SEQ ID NO: 49). Продукт слияния T22d35-Fc-IgG1-v1 (CC) (SEQ ID NO: 6; WO2018/158727) использовали в качестве положительного контроля (CTL). Полные последовательности белка 61 (p61), белка 96 (p96), белка 101 (p101), белка 107 (p107) и белка 112 (p112) приведены под SEQ ID NO: 81, 84, 87, 89 и 92 соответственно (таблица 2).

Таблица 4. Структуры иллюстративных средств, связывающих TGFβ, в соответствии с определенными вариантами осуществления

Средство, связывающее TGFβ	Линкер 1		Линкер 2		Мультимеризующий домен	
	SEQ ID NO	Длина (аминокислоты)	SEQ ID NO	Длина (аминокислоты)	SEQ ID NO	Название
T22d35-Fc-IgG1-v1 (CC) (положительный контроль)	7	34	4	10	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 61	8	18	9	16	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 93	10	24	9	16	50	hIgG4Fc

Белок 94	10	24	10	24	50	hIgG4Fc
Белок 96	8	18	9	16	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 97	10	24	4	10	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 99	11	30	11	30	50	hIgG4Fc
Белок 101	12	18	11	30	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 106	13	26	13	26	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 107	8	18	4	10	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 108	9	16	9	16	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 109	14	20	9	16	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 112	12	18	15	16	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 113	16	32	16	32	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 115	16	32	16	32	50	hIgG4Fc
Белок 116	16	32	7	34	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 128	12	18	11	30	50	hIgG4Fc
Белок 129	12	18	17	30	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 130	12	18	18	30	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 131	12	18	19	30	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 132	8	18	19	30	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 133	8	18	11	30	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 134	8	18	20	16	49	hIgG1Fc(CC)
Белок 135	21	18	9	16	49	hIgG1Fc(CC)

[0255] *Получение и очистка рекомбинантных слитых молекул.* Все конструкции содержали последовательность сигнала секреции MDWTWRILFLVAAATGTHA (SEQ ID NO: 104) на N-конце при экспрессии. Комплементарные (с) ДНК, кодирующие конструкции, получали синтетически (GeneArt, ThermoFisher Scientific). cDNA клонировали в EcoR1 (5'-конец) и BamH1 (3'-конец) плазмидного вектора экспрессии у млекопитающих pTT5 (Durocher et al., 2002). Иллюстративные последовательности cDNA, используемые для экспрессии слитых белков, приведены в таблице 2 (SEQ ID NO: 106-109, используемые для экспрессии p61, p96, p101 и p128 соответственно). Сигнальный пептид отщепляется в клетках во время экспрессии и не включается в очищенные слитые белки.

[0256] Слитые белки экспрессировали путем транзientной трансфекции клеток яичника китайского хомячка (CHO). Вкратце, каждую из экспрессионных плазмид, кодирующих слитые белки, трансфицировали в 100 мл культуры клеток CHO-3E7 в среде Freestyle F17

(Invitrogen), содержащей 4 мМ глутамина и 0,1% Kolliphor p-188 (Sigma).

[0257] Все культивирование клеток проводили при 37°C, 5% CO₂. Условия трансфекции были следующими: трансфицированная ДНК состояла из плазмидной ДНК для экспрессии слитого белка и 30% ДНК из молок лососевых, которую смешивали с полиэтиленимином-про (Polyplus) при соотношении = 1:4. Через 24 часа после трансфекции добавляли подпитку в виде 1% триптона N1 (TekniScience Inc.). Добавляли 0,5 мМ VPA (Sigma), и температуру в инкубаторе снижали до 32°C, 5% CO₂. Это делали для стимулирования продуцирования и секреции слитых белков и поддерживали в течение 4 дней после трансфекции (dpt), после чего культуры собирали. В день 4 собранную надосадочную жидкость отфильтровывали (0,2 мкм) и очищали с помощью АКТА Pure на 25 л (GE). Надосадочную жидкость загружали в колонку MabSelect PrismA с белком А и очищали с помощью аффинной хроматографии. Затем колонку промывали 8 объемами колонки PBS, и белок элюировали 5 объемами колонки 0,1 М цитрата натрия, pH 3,2. Затем во фракциях буфер заменяли на буфер для составления (20 мМ L-гистидина, 100 мМ NaCl, pH 7) с применением обессоливающей колонки HiPrep 26/10 (GE).

[0258] На фиг. 3А и 3В показан анализ посредством электрофореза в полиакриламидном геле образцов очищенных белков 61, 96, 101, 107 и 112 (см. дорожки, обозначенные как p61, p96, p101, p107 и p112 соответственно) и T22d35-Fc-IgG1-v1 (CC) (Ctl) как в невосстанавливающих (фиг. 3А), так и в восстанавливающих (фиг. 3В) условиях. Белки (Р) подвергали электрофорезу в 12% акриламидном Bis-Tris-геле (12% Bis-Tris-гели для белков NuPAGE™, № по каталогу NP0341BOX, Life Technologies) как в невосстанавливающих, так и в восстанавливающих условиях. Эти слитые белки представляют собой тетравалентные гомодимерные средства, связывающие TGFβ, каждое из которых содержит две полипептидных цепи (т. е. они являются гомодимерами из двух полипептидных цепей, при этом первый и второй полипептиды являются одинаковыми, и каждый полипептид содержит два лиганд-связывающих домена). Две полипептидные цепи димеризуются посредством дисульфидных мостиков, в образовании которых участвуют один или несколько остатков цистеина в их мультимеризующих доменах, что подтверждается различием в размере при восстанавливающих условиях по сравнению с невосстанавливающими.

[0259] *Подавление форм активности TGFβ1 и TGFβ3 слитыми белками.* Для определения значений эффективности подавления у белков 61, 96, 101, 107 и 112 оценивали нейтрализацию TGFβ и сравнивали эффективность подавления с положительным контролем (T22d35-Fc-IgG1-v1 (CC), два дуплета TGFβRII-ECD, связанные посредством

Fc-части (SEQ ID NO: 6)). Следует отметить, что одиночный не слитый с Fc эктодомен TGF β RII (SEQ ID NO: 1) не нейтрализует ни один из TGF β 1, β 2 или β 3 (De Crescenzo et al, 2004). Термины "эффективность подавления" и "эффективность нейтрализации" используются в данном документе взаимозаменяемо.

- 5 [0260] Значения эффективности нейтрализации TGF β для очищенных слитых белков определяли с применением клеточного анализа передачи сигнала, а именно анализа высвобождения IL-11 клетками A549 с применением колориметрического ELISA. Вкратце, раковые клетки легкого человека A549 (ATCC-CCL-185, Cedarlane, Берлингтон, Онтарио) высевали в 96-луночные планшеты (5×10^3 клеток/лунка) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. На следующий день 10 пМ TGF β в полной среде в 10 отсутствие или в присутствии возрастающих концентраций слитого белка инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре (RT) перед добавлением к клеткам. После 24 часов (ч.) инкубации кондиционированную среду собирали и хранили при 4°C. На следующий день проводили ELISA для IL-11 в соответствии с инструкциями 15 производителя (набор DuoSet для ELISA IL-11 человека, № по каталогу DY218, R&D Systems, Inc.). Этот анализ высвобождения IL-11 служит моделью TGF β -опосредованной передачи сигнала: относительное высвобождение IL-11 после обработки с помощью TGF β является мерой активности TGF β . Снижение высвобождения IL-11 после добавления тестируемого слитого белка указывает на активность TGF β . Данные наносили на график и 20 анализировали с применением Prism8 (GraphPad, Сан-Диего) для построения кривой зависимости доза-ответ по значениям поглощения с применением 4-параметрической аппроксимирующей логистической модели (поглощение в зависимости концентрации). Затем значения нормализовали относительно положительного контроля (обработки TGF β в отсутствие какого-либо ингибитора).
- 25 [0261] Результаты иллюстративной серии экспериментов показаны на фиг. 4А и 4В, на которых эффективность подавления у белков 61, 96, 101, 107 и 112 в отношении TGF β 1 и TGF β 3 сравнивали с положительным контролем (SEQ ID NO: 6). Наибольшую эффективность наблюдали с положительным контролем. Однако положительный контроль также характеризовался самым высоким соотношением IC₅₀ в отношении TGF β 3: TGF β 1 30 (3,41 в данном эксперименте). В отличие этого, соотношения IC₅₀ в отношении TGF β 3:TGF β 1 у белков 61, 96, 101, 107 и 112 составляли 1,66, 1,72, 1,51, 1,24 и 1,95 соответственно в данном эксперименте (фиг. 4А-4В).

Таблица 5. Значения эффективности подавления в анализе высвобождения IL-11 из A549 у иллюстративных средств, связывающих TGF β , в соответствии с

определенными вариантами осуществления.

Средство, связывающее TGFβ	TGFβ1		TGFβ3		Соотношение IC ₅₀ TGFβ3: TGFβ1		n (число повторностей)
	Средняя IC ₅₀ (пМ)	SEM	Средняя IC ₅₀ (пМ)	SEM	Среднее соотношение	SE М	
Белок 61	6,38	0,29	10,63	0,05	1,67	0,07	2
Белок 96	6,47	0,57	11,22	1,13	1,73	0,02	2
Белок 101	6,75	0,25	9,73	0,57	1,44	0,07	5
Белок 106	3,27	0,15	8,27	0,63	2,54	0,31	2
Белок 107	8,06	0,85	11,81	1,74	1,46	0,12	3
Белок 112	15,74	0,42	29,58	1,28	1,88	0,03	2
Белок 113	2,19	0,37	5,73	1,17	2,49	0,24	6
Белок 115	2,59	0,49	5,11	0,91	2,00	0,31	3
Белок 116	2,44	0,14	6,17	0,12	2,53	0,10	3
Белок 128	6,67	0,44	8,42	0,72	1,28	0,12	4
Белок 129	15,22	1,48	26,47	5,11	1,73	0,29	5
Белок 130	7,09	0,49	8,91	1,45	1,24	0,27	3
Белок 131	5,71	0,79	7,70	1,25	1,31	0,33	3
Белок 132	5,99	0,31	8,00	0,07	1,34	0,08	2
Белок 133	4,79	0,54	8,35	0,82	1,77	0,18	3
Белок 134	20,24	3,44	29,57	4,17	1,54	0,47	2
Белок 135	39,48	16,75	37,46	1,10	1,17	0,52	2

SEM: стандартная ошибка среднего

[0262] Результаты показывают, что изменение линкерных областей, а именно укорочение первой линкерной области и удлинение второй линкерной области, приводило к значительному снижению соотношения IC₅₀ в отношении TGFβ3:TGFβ1, что указывает на снижение преимущественного подавления TGFβ1 при сохранении эффективности подавления в пикомолярном диапазоне.

[0263] Другой набор иллюстративных связывающих средств показан на фиг. 5А-5В, на которых показан анализ посредством электрофореза в полиакриламидном геле образцов очищенных белков 112, 111, 106, 105, 104, 101, 99 и 71 соответственно в невосстанавливающих (фиг. 5А) и восстанавливающих (фиг. 5В) условиях.

[0264] В иллюстративной серии экспериментов, показанной на фиг. 6А-6В, показана эффективность нейтрализации у белков 113, 115 и 116 по сравнению с положительным контролем (SEQ ID NO: 6). Результаты также показаны в таблице 5. Результаты показывают, что эффективность подавления у этих белков была сопоставима с контролем в отношении TGF β 1, но значительно более высокой в отношении TGF β 3, что приводило к значительно более низкому соотношению IC₅₀ в отношении TGF β 3:TGF β 1.

[0265] В иллюстративной серии экспериментов, показанной на фиг. 7А-7В, показана эффективность нейтрализации у белков 101, 129 и 130 по сравнению с положительным контролем (SEQ ID NO: 6). Результаты также представлены в таблице 5. Результаты показывают, что эффективность подавления у этих белков была более низкой в отношении TGF β 1 по сравнению с контролем и приблизительно такой же (P101, P130) или более низкой (P129) в отношении TGF β 3, что приводило к значительно более низкому соотношению IC₅₀ в отношении TGF β 3:TGF β 1.

[0266] В иллюстративной серии экспериментов, показанной на фиг. 8А-8В, показана эффективность нейтрализации у белков 101, 131, 132 и 133 по сравнению с положительным контролем (SEQ ID NO: 6). Результаты также представлены в таблице 5. Результаты показывают, что эффективность подавления у этих белков была более низкой в отношении TGF β 1 по сравнению с контролем и приблизительно такой же или более высокой в отношении TGF β 3, что приводило к значительно более низкому соотношению IC₅₀ в отношении TGF β 3:TGF β 1.

[0267] В иллюстративной серии экспериментов, показанной на фиг. 9А-9В, показана эффективность нейтрализации у белков 96, 134 и 135 по сравнению с положительным контролем (SEQ ID NO: 6). Результаты также представлены в таблице 5. Результаты показывают, что эффективность подавления у этих белков была снижена в большей степени в отношении TGF β 1, чем в отношении TGF β 3, по сравнению с контролем, так что соотношение IC₅₀ в отношении TGF β 3:TGF β 1 было значительно более низким, чем для контроля. При сравнении белков 134 и 135 с белком 96 результаты показывают, что замена первого линкера либо второго линкера на линкер Gly-Ser приводила к значительному снижению эффективности подавления как в отношении TGF β 1, так и в отношении TGF β 3 при сохранении низкого соотношения IC₅₀ в отношении TGF β 3:TGF β 1.

[0268] *Мультемизующий домен не влияет на специфичность в отношении изоформ TGF β . Тестировали средства, связывающие TGF β , имеющие одинаковую область, связывающую TGF β , и отличающиеся только мультемизующим доменом, чтобы увидеть, какой эффект, если таковой имеется, мультемизующий домен оказывает на*

относительную эффективность подавления в отношении изоформ $TGF\beta 1$ и $TGF\beta 3$. Результаты показаны на фиг. 10A-10B, на которых показана эффективность нейтрализации белков 101 и 128 по сравнению с положительным контролем (SEQ ID NO: 6), и в таблице 5. На фиг. 10A-10B показан один иллюстративный анализ; результаты, усредненные из
5 нескольких анализов, приведены в таблице 5. Результаты показывают, что замена мультимеризующего домена с IgG1 (белок 101) на IgG4 (белок 128) не оказала существенного эффекта на эффективность подавления в отношении $TGF\beta 1$ и $TGF\beta 3$, как и ожидалось. Такой же результат получали для белков 61 и 96, а также для белков 113 и 115 (таблица 5).

10 **[0269]** *Нейтрализация изоформы $TGF\beta 2$* . Авторы настоящего изобретения также тестировали, влияют ли на относительное подавление $TGF\beta 2$ по сравнению с контролем средства, связывающие $TGF\beta$, предусмотренные в данном документе. Иллюстративная серия экспериментов показана на фиг. 11. Как показано на фиг. 11 для белков 61, 96 и 101, эффективность нейтрализации в отношении изоформы $TGF\beta 2$ была более чем в 1000 раз
15 ниже, чем в отношении изоформ $TGF\beta 1$ и $TGF\beta 3$ (другими словами, IC_{50} была более чем в 1000 раз выше), так же как и для контроля. Результаты демонстрируют, что уравнивание или смещение значений относительной эффективности подавления в отношении изоформ $TGF\beta 1$ и $TGF\beta 3$ не оказало существенного эффекта на очень низкое подавление изоформы $TGF\beta 2$.

20 **[0270]** Взятые вместе, результаты, о которых сообщается в данном документе, показывают, что укорочение первой линкерной области до менее чем 34 аминокислот и/или удлинение второй линкерной области до более чем 10 аминокислот было эффективным для снижения соотношения IC_{50} в отношении $TGF\beta 3:TGF\beta 1$ для этих связывающих средств, в некоторых случаях почти уравнивая значения эффективности подавления в отношении двух изоформ.

25 Следует отметить, что в некоторых случаях соотношение IC_{50} в отношении $TGF\beta 3:TGF\beta 1$ было снижено за счет повышения эффективности подавления в отношении $TGF\beta 3$ без отрицательного влияния на эффективность в отношении $TGF\beta 1$ (например, у белков 113, 115, 116). В других случаях соотношение снижалось главным образом за счет снижения эффективности подавления в отношении $TGF\beta 1$ без отрицательного влияния на
30 эффективность в отношении $TGF\beta 3$ (например, у белков 61, 96, 101, 107, 128), хотя в некоторых случаях также наблюдалось незначительное снижение эффективности в отношении $TGF\beta 3$. Тем не менее, все связывающие средства сохраняли значительно более высокую эффективность подавления как в отношении $TGF\beta 1$, так и в отношении $TGF\beta 3$, чем в отношении $TGF\beta 2$, что свидетельствует об их возможном применении в качестве

терапевтических средств для лечения ассоциированных с TGF β нарушений, в частности нарушений, опосредованных TGF β 3.

ПЕРЕЧЕНЬ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

- [0271] Akhurst, R.J. and Hata, A. Targeting the TGF β signaling pathway in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2012; 11: 790-811.
- [0272] Akhurst, R.J. Targeting TGF- β signaling for therapeutic gain. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2017; 3; 9: a022301.
- [0273] Allanore, Y., Simms, R., and Distler. Systemic Sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2015; 1:15002.
- 10 [0274] Baardsnes, J., Hinck, C.S., Hinck, A. P., O'Connor-McCourt, M.D. TbetaR-II Discriminates the High- And Low-Affinity TGF-beta Isoforms via Two Hydrogen-Bonded Ion Pairs. *Biochemistry.* 2009; 48(10): 2146-55.
- [0275] Boocock, G.R., Morrison, J.A., and Popovic, M. Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nature Genetics.* 2003; 23:97-101.
- 15 [0276] Bragado, P., Estrada, Y., and Parikh, F. TGF β 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF β -RIII and p38 β / β signaling. *Nat. Cell. Biol.* 2013; 15:1351-1361.
- [0277] De Crescenzo, G., Pham, P.L., Durocher, Y., Chao, H. and O'Connor-McCourt, M.D. Enhancement of the antagonistic potency of transforming growth factor-beta receptor extracellular domains by coiled coil-induced homo- and heterodimerization. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(25),
- 20 26013-26018.
- [0278] Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., and Gabbiani, G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Journal of Cell Biology.* 1993; 122(1):103-11.
- [0279] Durocher, Y., Perret, S., and Kamen, A. High-level and High-Throughput Recombinant
- 25 Protein Production by Transient Transfection of Suspension-Growing Human 293-EBNA1 Cells. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(2): E9.
- [0280] Gabrielli, A., Avvedimento, E.V., and Krieg, T. Scleroderma. *New England Journal of Medicine.* 2009; 360: 1989-2003.
- [0281] Gourh, P., Remmers, E.F., and Satpathy, A. Transforming Growth Factor Beta 3 (TGFB3)
- 30 – a Novel Systemic Sclerosis Susceptibility Locus Involved in Fibrosis and Th17 Cell Development Identified By Genome-Wide Association Study in African Americans from the Genome Research in African American Scleroderma Patients Consortium. *Arthritis Rheumatol.* 2017; 69 (suppl 10).
- [0282] Grutter, C., Wilkinson, T., Turner, R., Podichetty, S., Finch, D., McCourt, M., Loning, S.,

Jermutus, L., and Grutter, M.G. A Cytokine-Neutralizing Antibody as a Structural Mimetic of 2 Receptor Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105(51): 20251-6.

[0283] Herbertz, S., Sawyer, J.S., and Stauber, A.J. Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway. *Drug Design, Development and Therapy*. 2015; 5: 4479-4499.

[0284] Hunzelmann, N. and Krieg, T. Scleroderma: from pathophysiology to novel therapeutic approaches. *Experimental Dermatology*. 2010; 19(5):393-400.

[0285] Komai, I.D. and Okamura, T. Reevaluation of Pluripotent Cytokine TGF- β 3 in Immunity. *Int. J. Mol. Sci*. 2018; 19: 2261.

[0286] Kissin, E.Y., Merkel, P.A., and Lafyatis, R. Myofibroblasts and hyalinized collagen as markers of skin disease in systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatism*. 2006; 54(11):3655-60.

[0287] Lacouture, M.E. and Morris, J.C. Cutaneous keratoacanthomas/squamous cell carcinomas associated with neutralization of transforming growth factor β by the monoclonal antibody fresolimumab (GC1008). *Cancer Immunol. Immunother*. 2015; 64: 437-446.

[0288] Langer, J.C., Henckaerts, E., Orenstein, J., and Snoeck, H.W. Quantitative trait analysis reveals transforming growth factor-beta2 as a positive regulator of early hematopoietic progenitor and stem cell function. *J. Exp. Med*. 2004; 199(1): 5-14.

[0289] Lafyatis, R. Transforming growth factor β --at the centre of systemic sclerosis. *Nature reviews Rheumatology*. 2014; 10(12):706-19.

[0290] Leask, A. Targeting the TGF β , endothelin-1 and CCN2 axis to combat fibrosis in scleroderma. *Cell Signal*. 2008; 20(8): 1409-14.

[0291] Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K., and Flavell, R.A. Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol*. 2006; 24, 99-146.

[0292] Martin, C.J., Datta, A., Littlefield, C., Kalra, A., Chapron, C., Wawersik, S., Dagbay, K.B., Brueckner, C.T., Nikiforov, A., Danehy Jr., F.T., Streich Jr., F.C., Boston, C., Simpson, A., Jackson, J.W., Lin, S., Danek, N., Faucette, R.R., Raman, P., Capili, A.D., Buckler, A., Carven, G.J., and Schurpf, T. Selective Inhibition of TGF β 1 Activation Overcomes Primary Resistance to Checkpoint Blockade Therapy by Altering Tumor Immune Landscape. *Sci. Transl. Med*. 2020; 12(536): eaay8456.

[0293] Mayes, M.D., Lacey, J.V., and Beebe-Dimmer, J. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum*. 2003; 48: 2246-2255.

[0294] Meng, X.-M., Nikolic-Paterson, D.J., and Lan, H.Y. TGF β : the master regulator of fibrosis. *Nat. Rev. Nephrology*. 2016; 12: 325-338.

- [0295] Midgley, A.C., Rogers, M., Hallett, M.B., Clayton, A., Bowen, T., and Phillips, A.O. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-stimulated fibroblast to myofibroblast differentiation is mediated by hyaluronan (HA)-facilitated epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD44 co-localization in lipid rafts. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013; 288(21):14824-38.
- 5 [0296] Morris, J.C., Tan, A.R., Olencki, T.E., Shapiro, G.I., Dezube, B.J., Reiss, M., Hsu, F.J., Berzofsky, J.A., and Lawrence, D.P. Phase I Study of GC1008 (Fresolimumab): A Human Anti-Transforming Growth Factor-Beta (TGF β) Monoclonal Antibody in Patients With Advanced Malignant Melanoma or Renal Cell Carcinoma. *PLoS One*. 2014; 9(3):e90353.
- [0297] Nanthakumar, D.B., Hatley, R.J.D., and Lemma, S. Dissecting fibrosis: therapeutic
10 insights from the small-molecule toolbox. *Nat. Rev. Drug Disc.* 2015; 14: 693-720.
- [0298] Prud'homme, G.J. Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab Invest*. 2007;87(11):1077-91.
- [0299] Rice, L.M., Ziemek, J., and Stratton, E.A. A longitudinal biomarker for the extent of skin
15 disease in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol*. 2015; 67: 3004-3015.
- [0300] Rio, P. and Bueren, J.A. TGF- β : a master regulatory of the bone marrow failure puzzle in Fanconi anemia. *Stem Cell Investig*. 2016; 3: 75 doi: 10.21037/sci.2016.09.17.
- [0301] Roberts, A.B., Roche, N.S., and Winokur, T.S. Role of transforming growth factor-beta in
20 maintenance of function of cultured neonatal cardiac myocytes. Autocrine action and reversal of damaging effects of interleukin-1. *J. Clin. Invest*. 1992; 90(5): 2056-2062.
- [0302] Rogers, Z.R. Shwachman-Diamond Syndrome. 2018. UpToDate; <https://www.uptodate.com/contents/shwachman-diamond-syndrome/print>.
- [0303] Tatusova, T.A. and Madden, T. L. Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett*. 1999; 174:247-250.
- 25 [0304] Todd, N.W., Atamas, S.P., Luzina, I.G., and Galvin, J.R. Permanent alveolar collapse is the predominant mechanism in idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2015; 9(4):411-8.
- [0305] Vannucchi, A.M., Bianchi, L., and Paoletti, F. A pathobiologic pathway linking thrombopoietin, GATA-1, and TGF-beta1 in the development of myelofibrosis. *Blood*. 2005; 105:
30 3493-501.
- [0306] Varga, J. and Abraham, D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J. Clin. Invest*. 2007; 117: 557-567.

[0307] Varga, J. and Pasche, B. Antitransforming growth factor- β therapy in fibrosis: recent progress and implications for systemic sclerosis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2008; 20(6):720-8.

[0308] Varga, J. and Whitfield, M.L. Transforming growth factor-beta in systemic sclerosis scleroderma. *Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library*. 2009; S1(1):226-35.

[0309] Vincenti, F., Fervenza, F.C., Campbell, K.N., Diaz, M., Gesualdo, L., Nelson, P., Praga, M., Radhakrishnan, J., Sellin, L., Singh, A., Thornley-Brown, D., Veronese, F.V., Accomando, B., Engstrand, S., Ledbetter, S., Lin, J., Neylan, J., Tumlin, J., Focal Segmental Glomerulosclerosis Study Group. A Phase 2, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Study of Fresolimumab in Patients With Steroid-Resistant Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Kidney Int. Rep.* 2017; 2(5):800-810.

[0310] Wang, J.C., Chang, T.H., and Goldberg, A. Quantitative analysis of growth factor production in the mechanism of fibrosis in agnogenic myeloid metaplasia. *Exp. Hematol.* 2006; 34(12):1617-23.

[0311] Wang, H., Wang, B., Zhang, A., Hassounah, F., Seow, Y., Wood, M., Ma, F., Klein, J.D., Price, S.R., and Wang, X.H. Exosome-Mediated miR-29 Transfer Reduces Muscle Atrophy and Kidney Fibrosis in Mice. *Mol. Ther.* 2019; 27(3): 571-583.

[0312] Zhang, H., Korono, D.E., and O'Connor, K.W. Stem cell defects and bone marrow failure in Fanconi anemia. *Cell Stem Cell*. 2016; 18: 668-681.

[0313] Содержание всех документов и литературных источников, цитируемых в данном документе, включено в него посредством ссылки в полном своем объеме.

[0314] Хотя настоящее изобретение подробно описано со ссылкой на его варианты осуществления, эти варианты осуществления предлагаются для иллюстрации, но не для ограничения настоящего изобретения. Возможно создание других вариантов осуществления, в которых используются принципы настоящего изобретения и которые находятся в пределах его сущности и объема, определяемого в прилагаемой к настоящему документу формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Заявляется:

1. Полипептидная конструкция, применимая для подавления эффекта изоформы трансформирующего фактора роста бета (TGF β), при этом конструкция содержит TGF β -связывающую область и мультимеризующий домен; где N-конец мультимеризующего домена соединен с С-концом TGF β -связывающей области;
- 10 где TGF β -связывающая область содержит, в ориентации от N- к С-концу, N-концевую область, первый лиганд-связывающий домен рецептора TGF β (TGF β R-LBD), первый линкер, второй лиганд-связывающий домен TGF β R и второй линкер; где эффективность подавления полипептидной конструкции в отношении как активности изоформы TGF β 1, так и активности изоформы TGF β 3 больше, чем в отношении
- 15 активности изоформы TGF β 2, и где первый линкер и второй линкер выбраны таким образом, что относительная эффективность подавления полипептидной конструкции в отношении активности изоформы TGF β 3 по сравнению с активностью изоформы TGF β 1 (соотношение IC₅₀ для TGF β 3:TGF β 1) составляет приблизительно 2,5:1 или меньше.
- 20 2. Полипептидная конструкция по п. 1, где относительная эффективность подавления полипептидной конструкции в отношении активности изоформы TGF β 3 по сравнению с активностью изоформы TGF β 1 (соотношение IC₅₀ для TGF β 3:TGF β 1) составляет менее приблизительно 2,5:1, приблизительно 2,3:1 или меньше, приблизительно 2:1 или меньше, приблизительно 1,8:1 или меньше, приблизительно 1,5:1 или меньше, приблизительно 1,3:1
- 25 или меньше, приблизительно 1:1 или меньше, приблизительно 1:1 или меньше, приблизительно 0,8:1 или меньше или приблизительно 0,5:1 или меньше.
3. Полипептидная конструкция по п. 1 или п. 2, где относительная эффективность подавления полипептидной конструкции в отношении активности изоформы TGF β 3 по сравнению с активностью изоформы TGF β 1 (соотношение IC₅₀ для TGF β 3:TGF β 1) составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 2:1.
- 30 4. Полипептидная конструкция по п. 3, где относительная эффективность подавления полипептидной конструкции в отношении активности изоформы TGF β 3 по сравнению с активностью изоформы TGF β 1 (соотношение IC₅₀ для TGF β 3:TGF β 1) составляет приблизительно 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1 или 1,9:1.

5. Полипептидная конструкция по п. 4, где относительная эффективность подавления полипептидной конструкции в отношении активности изоформы TGF β 3 по сравнению с активностью изоформы TGF β 1 (соотношение IC₅₀ для TGF β 3:TGF β 1) составляет от приблизительно 1,4:1 до приблизительно 1,6:1.
- 5 6. Полипептидная конструкция по п. 5, где относительная эффективность подавления полипептидной конструкции в отношении активности изоформы TGF β 3 по сравнению с активностью изоформы TGF β 1 (соотношение IC₅₀ для TGF β 3:TGF β 1) составляет приблизительно 1,4:1, приблизительно 1,5:1 или приблизительно 1,6:1.
- 10 7. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-6, где полипептидная конструкция подавляет как активность изоформы TGF β 1, так и активность изоформы TGF β 3 с эффективностью, с в по меньшей мере 20 раз, 100 раз, 200 раз, 300 раз, 400 раз, 500 раз, 600 раз, 700 раз, 800 раз, 900 раз или 1000 раз большей, чем активность изоформы TGF β 2.
8. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-7, где первый линкер составляет 33 аминокислоты или меньше.
- 15 9. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-8, где второй линкер составляет 10 аминокислот или больше.
10. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-9, где один или несколько из первого линкера и второго линкера предусматривают линкер на основе IDR, вариант линкера на основе IDR, гибридный линкер, вариант гибридного линкера, усеченный
- 20 линкер, вариант усеченного линкера или удлиненный линкер или состоят из них.
11. Полипептидная конструкция по п. 10, где один из первого линкера и второго линкера предусматривает линкер, отличный от линкера на основе IDR, или состоит из него.
12. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-10, где как часть первого линкера, так и часть второго линкера предусматривают линкер на основе IDR, вариант линкера на
- 25 основе IDR, гибридный линкер, вариант гибридного линкера, усеченный линкер, вариант усеченного линкера или удлиненный линкер или состоят из них.
13. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-12, где первый линкер составляет 10 аминокислот или больше, 15 аминокислот или больше или 18 аминокислот или больше.
14. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-13, где длина первого линкера
- 30 составляет от приблизительно 15 до 33 аминокислот или от приблизительно 18 до приблизительно 30 аминокислот.
15. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-14, где длина первого линкера составляет приблизительно 16, приблизительно 18, приблизительно 30 или приблизительно 32 аминокислоты.

16. Полипептидная конструкция по п. 15, где длина первого линкера составляет 18 аминокислот.
17. Полипептидная конструкция по п. 15, где длина первого линкера составляет 16 аминокислот.
- 5 18. Полипептидная конструкция по п. 15, где длина первого линкера составляет 30 аминокислот.
19. Полипептидная конструкция по п. 15, где длина первого линкера составляет 32 аминокислоты.
20. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-19, где второй линкер составляет
10 35 аминокислот или меньше, или его длина составляет от 10 до 34 аминокислот.
21. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-20, где длина второго линкера составляет от приблизительно 15 до приблизительно 35 аминокислот.
22. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-21, где длина второго линкера составляет приблизительно 16, приблизительно 30, приблизительно 32 или приблизительно
15 34 аминокислоты.
23. Полипептидная конструкция по п. 22, где длина второго линкера составляет 30 аминокислот.
24. Полипептидная конструкция по п. 22, где длина второго линкера составляет 16 аминокислот.
- 20 25. Полипептидная конструкция по п. 22, где длина второго линкера составляет 32 аминокислоты.
26. Полипептидная конструкция по п. 22, где длина второго линкера составляет 34 аминокислоты.
27. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-26, где один или несколько из
25 первого линкера и второго линкера содержат аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 4 и 8-26, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоят из нее.
- 30 28. Полипептидная конструкция по п. 27, где первый линкер содержит аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 21, 22, 23 и 26, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее.

29. Полипептидная конструкция по п. 27 или п. 28, где второй линкер содержит аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 4, 9, 11, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25 и 26, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%,
5 по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее.

30. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-29, где первый линкер содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 12, или состоит из нее.

31. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-29, где первый линкер содержит
10 аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 8, или состоит из нее.

32. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-31, где второй линкер содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, или состоит из нее.

33. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-31, где второй линкер содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 9, или состоит из нее.

15 34. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-29, где первый линкер содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся:

(а) делецией по меньшей мере одного N-концевого аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 8;

20 (b) делецией по меньшей мере одного C-концевого аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 8;

(с) делецией по меньшей мере одного внутреннего аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 8, или

25 (d) одной или несколькими заменами в аминокислотной последовательности по сравнению с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 8 или любой из (а) – (с), или состоит из нее.

35. Полипептидная конструкция по п. 34, где делеция аминокислот представляет собой делецию 16 аминокислот из SEQ ID NO: 3.

36. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-35, где второй линкер содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся:

30 (а) делецией по меньшей мере одного N-концевого аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11;

(b) делецией по меньшей мере одного C-концевого аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11;

(с) делецией по меньшей мере одного внутреннего аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11, или

(d) одной или несколькими заменами в аминокислотной последовательности по сравнению с SEQ ID NO: 4, 9 или 11 или любой из (а) – (с), или состоит из нее.

5 37. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-36, где N-концевая область содержит линкер на основе IDR, вариант линкера на основе IDR, гибридный линкер, вариант гибридного линкера, усеченный линкер, вариант усеченного линкера или удлиненный линкер или состоит из них.

10 38. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-37, где N-концевая область содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 3, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее.

15 39. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-38, где один или несколько из первого TGFβR-LBD и второго TGFβR-LBD содержат аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоят из нее.

20 40. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-39, где первый TGFβR-LBD и второй TGFβR-LBD являются одинаковыми или практически одинаковыми.

25 41. Полипептидная конструкция по п. 40, где оба из первого TGFβR-LBD и второго TGFβR-LBD содержат аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоят из нее.

42. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-41, где мультимеризующий домен обеспечивает димеризацию полипептидной конструкции со второй полипептидной конструкцией, указанной в любом из пп. 1-41, нековалентным образом.

30 43. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-41, где мультимеризующий домен обеспечивает димеризацию полипептидной конструкции со второй полипептидной конструкцией, указанной в любом из пп. 1-41, ковалентным образом.

44. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-43, где мультимеризующий домен содержит одну или несколько константных областей антителя.

45. Полипептидная конструкция по п. 44, где мультимеризующий домен содержит второй константный домен (C_H2) и/или третий константный домен (C_H3) тяжелой цепи антитела.
46. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-45, где мультимеризующий домен
5 содержит Fc-область тяжелой цепи антитела.
47. Полипептидная конструкция по любому из пп. 44-46, где антитело представляет собой антитело IgG.
48. Полипептидная конструкция по п. 47, где антитело IgG представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, необязательно антитело человека.
- 10 49. Полипептидная конструкция по п. 48, где мультимеризующий домен характеризуется по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с константной областью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.
- 15 50. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-49, где мультимеризующий домен содержит остатки цистеина для сшивания полипептидной конструкции со второй полипептидной конструкцией, указанной в любом из пп. 1-49.
51. Полипептидная конструкция по п. 50, где мультимеризующий домен содержит по меньшей мере два остатка цистеина для образования дисульфидного мостика со второй
20 полипептидной конструкцией.
52. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-51, где мультимеризующий домен сконструирован для снижения агрегации или для модуляции стабильности димера или мультимера полипептидной конструкции.
53. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-52, где мультимеризующий домен
25 содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:49, или состоит из нее.
54. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-52, где мультимеризующий домен содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:50, или состоит из нее.
- 30 55. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-52, где мультимеризующий домен содержит аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 49-80, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее.

56. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-55, где TGF β -связывающая область содержит аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 27-48, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%,
5 по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее.

57. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-56, где TGF β -связывающая область содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 27, или состоит из нее.

58. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-56, где TGF β -связывающая область
10 содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 29, или состоит из нее.

59. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-56, где TGF β -связывающая область содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 32, или состоит из нее.

60. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-56, где TGF β -связывающая область
15 содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 40, или состоит из нее.

61. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-56, где TGF β -связывающая область
20 содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 41, или состоит из нее.

62. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-61, где полипептидная конструкция
содержит аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO:
81-103 и 105, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по
меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%,
25 по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее.

63. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-61, где полипептидная конструкция
содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 81, или
последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере
90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере
30 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее.

64. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-61, где полипептидная конструкция
содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 84, или
последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере

90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее.

65. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-61, где полипептидная конструкция содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 87, или
5 последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее.

66. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-61, где полипептидная конструкция содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 95, или
10 последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее.

67. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-61, где полипептидная конструкция содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 96, или
15 последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоит из нее.

68. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-67, где полипептидная конструкция дополнительно содержит аминокислотную последовательность, подходящую для
20 экспрессии, выявления и/или очистки средства, связывающего TGFβ.

69. Полипептидная конструкция по п. 68, где полипептидная конструкция дополнительно содержит сигнальный пептид, характеризующийся последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 104, или последовательностью, практически идентичной ей.

70. Полипептидная конструкция по любому из пп. 1-69, где полипептидная конструкция
25 представляет собой димерный полипептид, содержащий первую и вторую полипептидные конструкции, указанные в любом из пп. 1-69, связанные между соответствующими доменами мультимеризации по меньшей мере одним дисульфидным мостиком.

71. Полипептидная конструкция по п. 70, где первая и вторая полипептидные конструкции содержат одинаковую или практически одинаковую аминокислотную
30 последовательность.

72. Полипептидная конструкция по п. 70, где первая и вторая полипептидные конструкции содержат разные аминокислотные последовательности.

73. Полипептидная конструкция по п. 72, где первая и вторая полипептидные конструкции содержат одинаковые или практически одинаковые мультимеризующие домены и разные TGF β -связывающие области.

74. Полипептидная конструкция по любому из пп. 70-73, где первая полипептидная и/или вторая полипептидная конструкция дополнительно содержит сайт для конъюгирования.

75. Полипептидная конструкция по п. 74, где первая полипептидная и/или вторая полипептидная конструкция конъюгирована с нацеливающим средством, терапевтическим фрагментом, выявляемым фрагментом или диагностическим фрагментом.

76. Полипептидная конструкция по п. 75, где нацеливающее средство, терапевтический фрагмент, выявляемый фрагмент или диагностический фрагмент предусматривают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающее средство, характеризующееся аффинностью в отношении другого представителя семейства TGF β или в отношении другой терапевтической мишени, средство лучевой терапии, средство для визуализации, флуоресцентный фрагмент, цитотоксическое средство, антимиотическое лекарственное средство, носитель на основе наночастиц, конъюгированное с полимером лекарственное средство, наноноситель, средство для визуализации, стабилизирующее средство, лекарственное средство, наноноситель или дендример.

77. Полипептидная конструкция, содержащая от N-конца к C-концу: (i) аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:40, и (ii) Fc-область IgG1 человека.

78. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептидную конструкцию по любому из пп. 1-77.

79. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 78, где молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептидную конструкцию в форме, которая секретируется выбранным экспрессирующим хозяином.

80. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая по меньшей мере один полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, изложенной под любым из SEQ ID NO: 81-103 и 105, или последовательностью, практически идентичной ей.

81. Молекула нуклеиновой кислоты, характеризующаяся последовательностью, изложенной под любым из SEQ ID NO: 106-109, или последовательностью, практически идентичной ей.

82. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 80, дополнительно содержащая на 5'-конце последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 110 или SEQ ID NO: 111, или последовательность, практически идентичную ей.

83. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 78-82.

5 84. Клеточный хозяин, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 78-82 или вектор по п. 83.

85. Средство, связывающее TGF β , содержащее

первую полипептидную конструкцию, указанную в любом из пп. 1-77, и

вторую полипептидную конструкцию, указанную в любом из пп. 1-77,

10 где первая полипептидная конструкция и вторая полипептидная конструкция ассоциированы вместе посредством их соответствующих мультимеризующих доменов,

где эффективность подавления средства, связывающего TGF β , в отношении как активности изоформы TGF β 1, так и активности изоформы TGF β 3 больше, чем в отношении активности изоформы TGF β 2, и

15 где первый линкер и второй линкер выбраны таким образом, что относительная эффективность подавления средства, связывающего TGF β , в отношении активности изоформы TGF β 3 по сравнению с активностью изоформы TGF β 1 (соотношение IC₅₀ для TGF β 3 TGF β 1) составляет приблизительно 2,5:1 или меньше.

86. Средство, связывающее TGF β , по п. 85, где относительная эффективность
20 подавления средства, связывающего TGF β , в отношении активности изоформы TGF β 3 по сравнению с активностью изоформы TGF β 1 (соотношение IC₅₀ для TGF β 3:TGF β 1) составляет менее чем приблизительно 2,5:1, приблизительно 2,3:1 или меньше, приблизительно 2:1 или меньше, приблизительно 1,8:1 или меньше, приблизительно 1,5:1 или меньше, приблизительно 1,3:1 или меньше, приблизительно 1:1 или меньше,
25 приблизительно 1:1 или меньше, приблизительно 0,8:1 или меньше или приблизительно 0,5:1 или меньше.

87. Средство, связывающее TGF β , по п. 85 или п. 86, где относительная эффективность
подавления средства, связывающего TGF β , в отношении активности изоформы TGF β 3 по
сравнению с активностью изоформы TGF β 1 (соотношение IC₅₀ для TGF β 3:TGF β 1)
30 составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 2:1.

88. Средство, связывающее TGF β , по п. 87, где относительная эффективность
подавления средства, связывающего TGF β , в отношении активности изоформы TGF β 3 по
сравнению с активностью изоформы TGF β 1 (соотношение IC₅₀ для TGF β 3:TGF β 1)
составляет приблизительно 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1 или 1,9:1.

89. Средство, связывающее TGF β , по п. 88, где относительная эффективность подавления средства, связывающего TGF β , в отношении активности изоформы TGF β 3 по сравнению с активностью изоформы TGF β 1 (соотношение IC₅₀ для TGF β 3:TGF β 1) составляет от приблизительно 1,4:1 до приблизительно 1,6:1.

5 90. Средство, связывающее TGF β , по п. 89, где относительная эффективность подавления средства, связывающего TGF β , в отношении активности изоформы TGF β 3 по сравнению с активностью изоформы TGF β 1 (соотношение IC₅₀ для TGF β 3:TGF β 1) составляет приблизительно 1,4:1, приблизительно 1,5:1 или приблизительно 1,6:1.

10 91. Средство, связывающее TGF β , по любому из пп. 85-90, где средство, связывающее TGF β , подавляет как активность изоформы TGF β 1, так и активность изоформы TGF β 3 с в по меньшей мере 20 раз, 100 раз, 200 раз, 300 раз, 400 раз, 500 раз, 600 раз, 700 раз, 800 раз или 900 раз большей эффективностью, чем активность изоформы TGF β 2.

15 92. Средство, связывающее TGF β , по любому из пп. 85-91, где средство, связывающее TGF β , представляет собой димер, где первая полипептидная конструкция и вторая полипептидная конструкция связаны вместе их соответствующими доменами мультимеризации посредством по меньшей мере одного дисульфидного мостика.

93. Средство, связывающее TGF β , по п. 92, где средство, связывающее TGF β , представляет собой гомодимер, при этом первая полипептидная конструкция и вторая полипептидная конструкция являются одинаковыми или практически одинаковыми.

20 94. Средство, связывающее TGF β , по п. 93, где первая полипептидная конструкция и вторая полипептидная конструкция содержат последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 81, 84, 87 или 96, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей,
25 или состоят из нее.

95. Средство, связывающее TGF β , по п. 93 или п. 94, где первая полипептидная конструкция и вторая полипептидная конструкция содержат последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 87, или состоят из нее.

30 96. Средство, связывающее TGF β , по п. 93 или п. 94, где первая полипептидная конструкция и вторая полипептидная конструкция содержат последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 96, или состоят из нее.

97. Средство, связывающее TGF β , по п. 93, где первая полипептидная конструкция и вторая полипептидная конструкция содержат последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 95, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по

меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоят из нее.

98. Средство, связывающее TGF β , по п. 97, где первая полипептидная конструкция и вторая полипептидная конструкция содержат последовательность, изложенную под SEQ ID NO:95, или состоят из нее.

99. Средство, связывающее TGF β , по п. 92, где средство, связывающее TGF β , представляет собой гетеродимер, при этом первая полипептидная конструкция и вторая полипептидная конструкция содержат разные аминокислотные последовательности.

100. Средство, связывающее TGF β , по п. 99, где первая полипептидная конструкция и вторая полипептидная конструкция содержат одинаковые или практически одинаковые мультимеризующие домены и разные TGF β -связывающие области.

101. Средство, связывающее TGF β , по п. 100, где разные TGF β -связывающие области содержат аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 27, 29, 87 и 96, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоят из нее.

102. Средство, связывающее TGF β , по п. 100, где разные TGF β -связывающие области содержат аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:95, или последовательность, на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей, или состоят из нее.

103. Средство, связывающее TGF β , содержащее

первую полипептидную конструкцию, содержащую от N-конца к С-концу: (i) аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:40, и (ii) первую Fc-область IgG1 человека, и

вторую полипептидную конструкцию, содержащую от N-конца к С-концу: (i) аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:40, и (ii) вторую Fc-область IgG1 человека,

где первая полипептидная конструкция и вторая полипептидная конструкция связаны вместе посредством первой и второй Fc-области IgG1 человека.

104. Средство, связывающее TGF β , по п. 103, где эффективность подавления средства, связывающего TGF β , в отношении как активности изоформы TGF β 1, так и активности изоформы TGF β 3 больше, чем в отношении активности изоформы TGF β 2, и относительная эффективность подавления средства, связывающего TGF β , в отношении активности

изоформы TGFβ3 по сравнению с активностью изоформы TGFβ1 (соотношение IC₅₀ TGFβ3 TGFβ1) составляет приблизительно 2,5:1 или меньше.

105. Средство, связывающее TGFβ, где средство, связывающее TGFβ, представляет собой гомодимер полипептидной конструкции по любому из пп. 1-77.

5 106. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептидную конструкцию по любому из пп. 1-77 или средство, связывающее TGFβ, по любому из пп. 85-105 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

107. Фармацевтическая композиция по п. 106, где композиция содержит полипептидную конструкцию по п. 64 или п. 67 или средство, связывающее TGFβ, по п. 95 или п. 96 или их
10 комбинацию.

108. Фармацевтическая композиция по п. 106, где композиция содержит полипептидную конструкцию по п. 66 или средство, связывающее TGFβ, по п. 98 или их комбинацию.

109. Фармацевтическая композиция по п. 106, где композиция содержит полипептидную конструкцию по п. 66 или средство, связывающее TGFβ, по п. 103 или их комбинацию.

15 110. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 106-109, где композиция составлена для введения путем инъекции или инфузии.

111. Фармацевтическая композиция по п. 110, где композиция составлена для внутривенного, подкожного, интраперитонеального или внутримышечного введения.

112. Способ изготовления полипептидной конструкции по любому из пп. 1-77 или
20 средства, связывающего TGFβ, по любому из пп. 85-105, при этом способ включает осуществление экспрессии первой полипептидной конструкции и/или второй полипептидной конструкции в клетке.

113. Способ по п. 112, дополнительно включающий культивирование клетки и выделение и/или очистку полипептидной конструкции или средства, связывающего TGFβ,
25 экспрессируемых в клетке.

114. Способ по п. 113, где полипептидная конструкция и/или средство, связывающее TGFβ, секретируются клеткой, и полипептидную конструкцию и/или средство, связывающее TGFβ, получают из среды, в которой клетку культивируют.

115. Способ лечения или предупреждения TGFβ-ассоциированного заболевания или
30 состояния у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение полипептидной конструкции по любому из пп. 1-77 или средства, связывающего TGFβ, по любому из пп. 85-105 субъекту с лечением или предупреждением таким образом TGFβ-ассоциированного заболевания или состояния у субъекта.

116. Способ по п. 115, где субъект является млекопитающим.

117. Способ по п. 116, где млекопитающее является человеком.

118. Способ по любому из пп. 115-117, где у субъекта имеется заболевание или состояние, опосредованное TGFβ1 и/или TGFβ3, или подозрение на его наличие.

5 119. Способ по любому из пп. 115-118, где у субъекта имеется заболевание или состояние, опосредованное TGFβ3, или подозрение на его наличие.

120. Способ лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованного TGFβ1 и/или TGFβ3, у субъекта, при этом способ включает введение полипептидной конструкции по любому из пп. 1-77 или средства, связывающего TGFβ, по любому из пп. 85-105 субъекту с лечением или предупреждением таким образом заболевания или
10 состояния, опосредованного TGFβ1 и/или TGFβ3, у субъекта.

121. Способ по п. 120, где заболевание опосредовано TGFβ3.

122. Способ по любому из пп. 115-121, где заболевание или состояние характеризуется сверхэкспрессией или сверхактивацией TGFβ1 и/или TGFβ3.

123. Способ по любому из пп. 115-122, где заболевание или состояние представляет
15 собой фиброз.

124. Способ по п. 123, где фиброз представляет собой легочный фиброз, идиопатический легочный фиброз, почечный фиброз, фиброз печени, фиброз легких, фиброз почек, фиброз костного мозга, системный склероз, фиброз кожи, фиброз сердца, миелофиброз, фибропролиферативное нарушение или нарушение соединительной ткани.

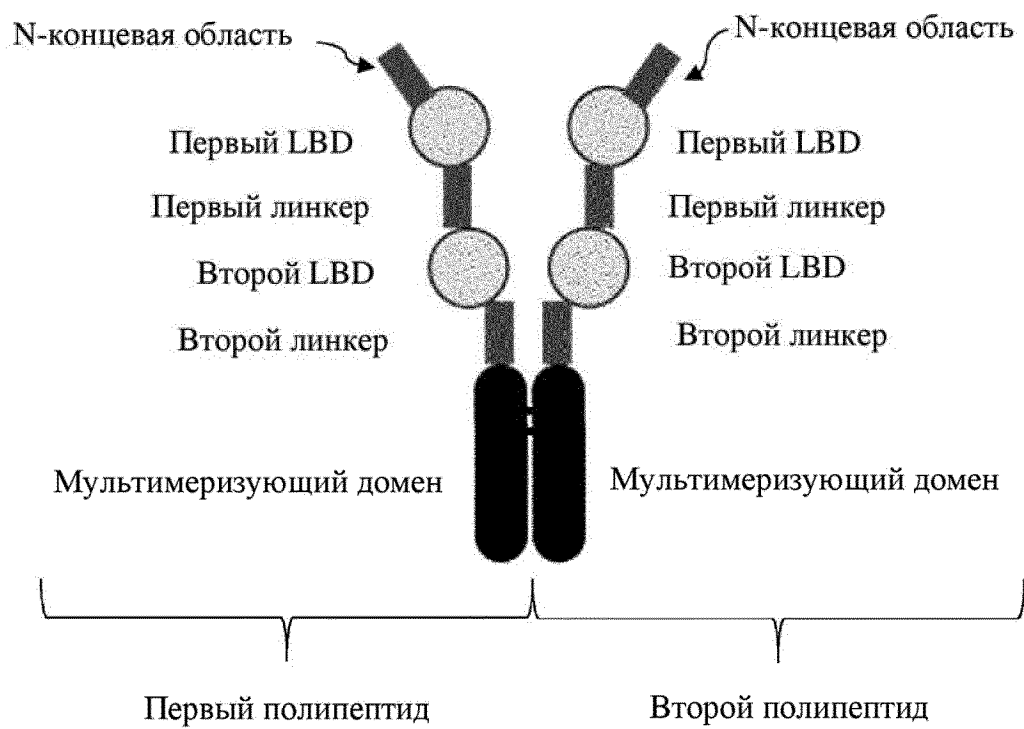
20 125. Способ по любому из пп. 115-122, где заболевание или состояние представляет собой заболевание, представляющее собой недостаточность костного мозга.

126. Способ по п. 125, где заболевание или состояние представляет собой синдром Швахмана-Бодиана-Даймонда или анемию Фанкони.

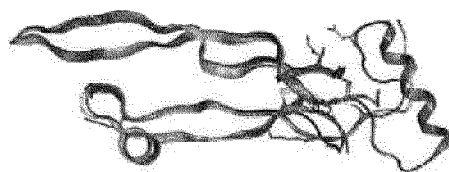
25 127. Способ изготовления полипептидной конструкции по любому из пп. 1-77 или средства, связывающего TGFβ, по любому из пп. 85-105, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 84 в условиях, подходящих для экспрессии белка, и сбор полипептидной конструкции по любому из пп. 1-77 или средства, связывающего TGFβ, по любому из пп. 85-105.

30 128. Полипептидная конструкция или средство, связывающее TGFβ, полученные посредством способа по п. 127.

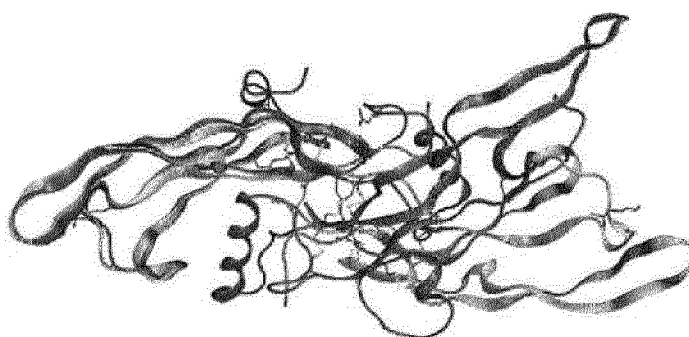
Фиг. 1



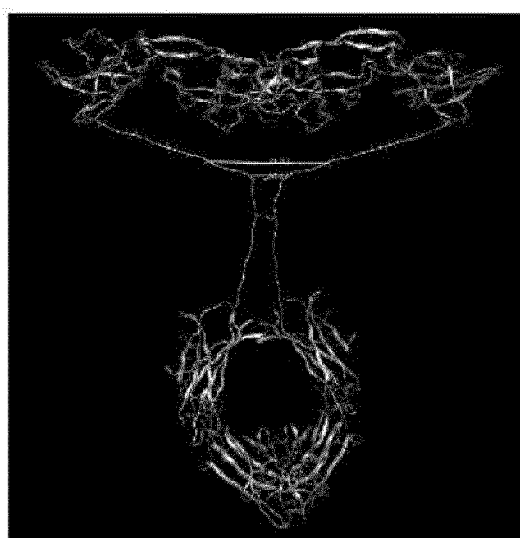
Фиг. 2А



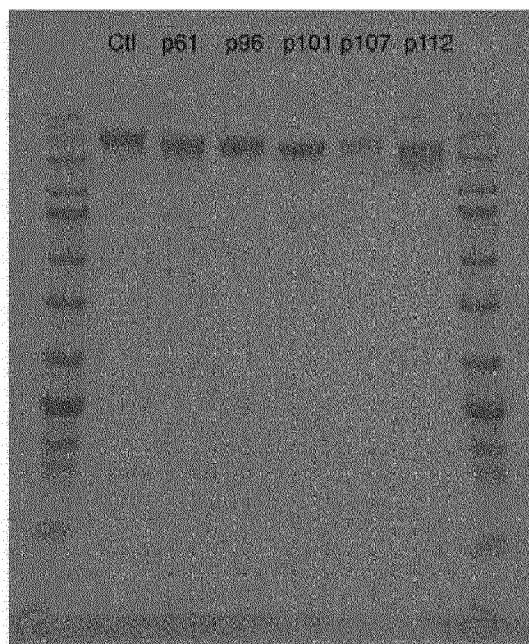
Фиг. 2В



Фиг. 2С

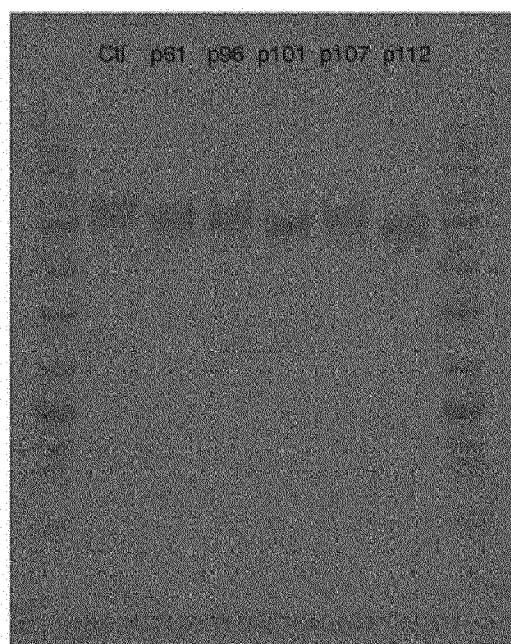


Фиг. 3А



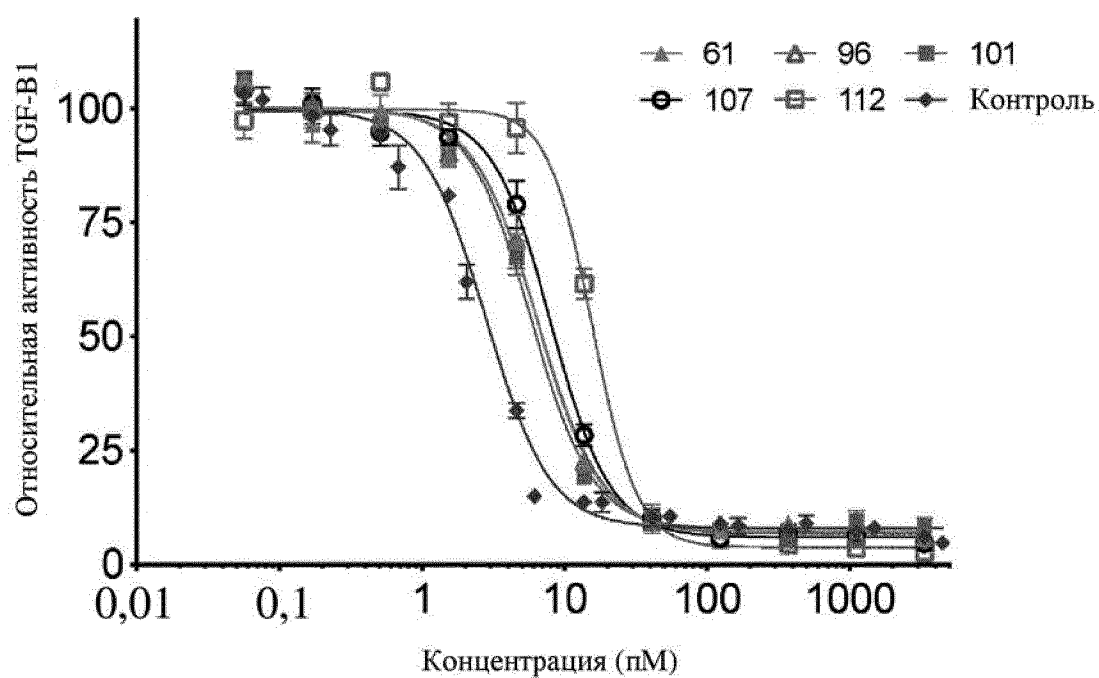
Невосстанавливающие
условия

Фиг. 3В



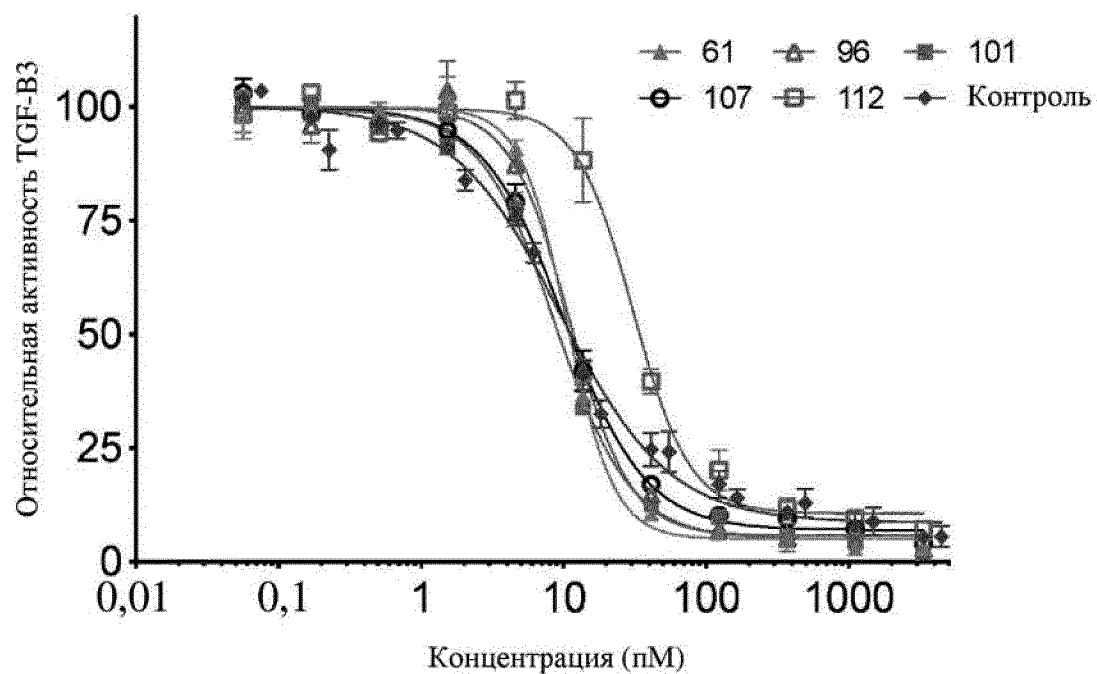
Восстанавливающие
условия

Фиг. 4А



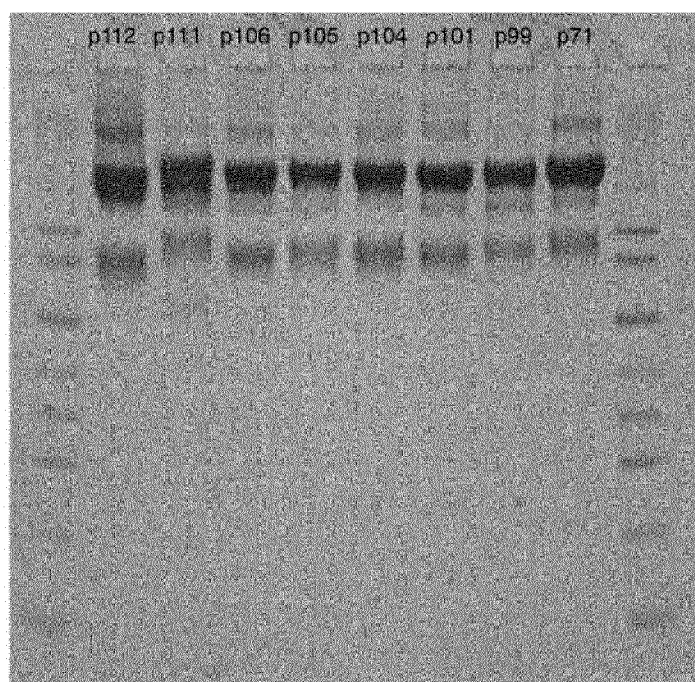
	Контроль	61	96	101	107	112
IC ₅₀	2,799	6,410	6,453	5,795	8,083	15,82

Фиг. 4В



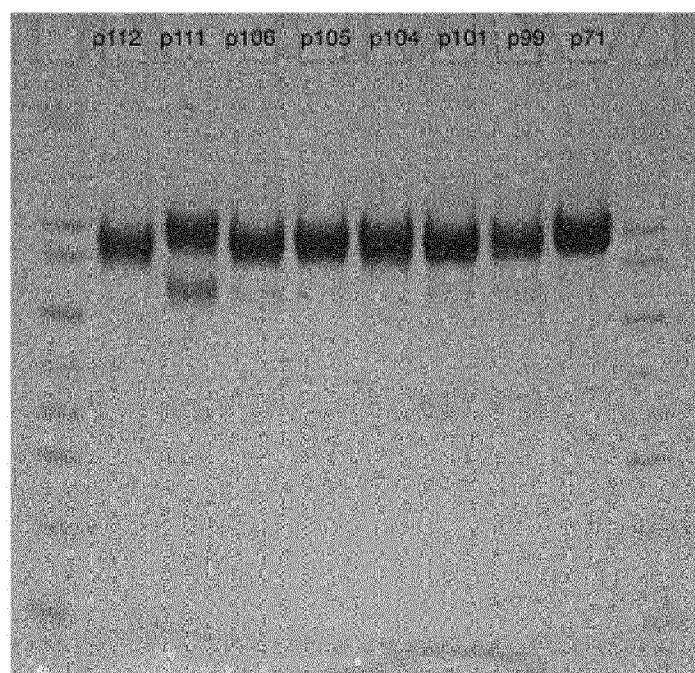
	Контроль	61	96	101	107	112
IC ₅₀	9,549	10,64	11,13	8,764	10,06	30,89

Фиг. 5А



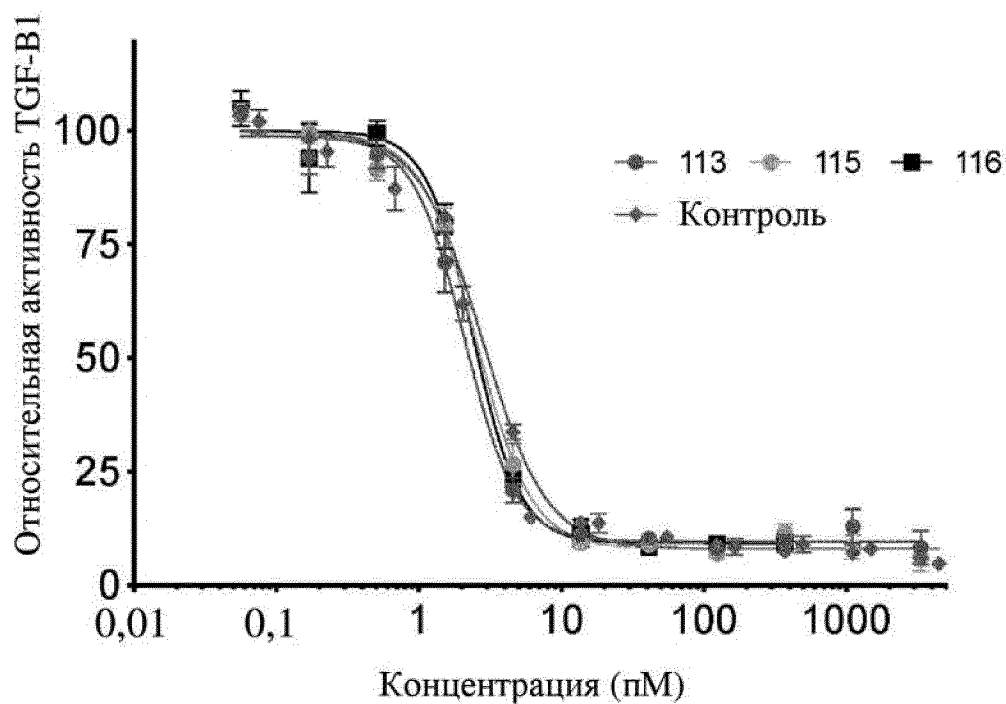
Невосстанавливающие
условия

Фиг. 5В



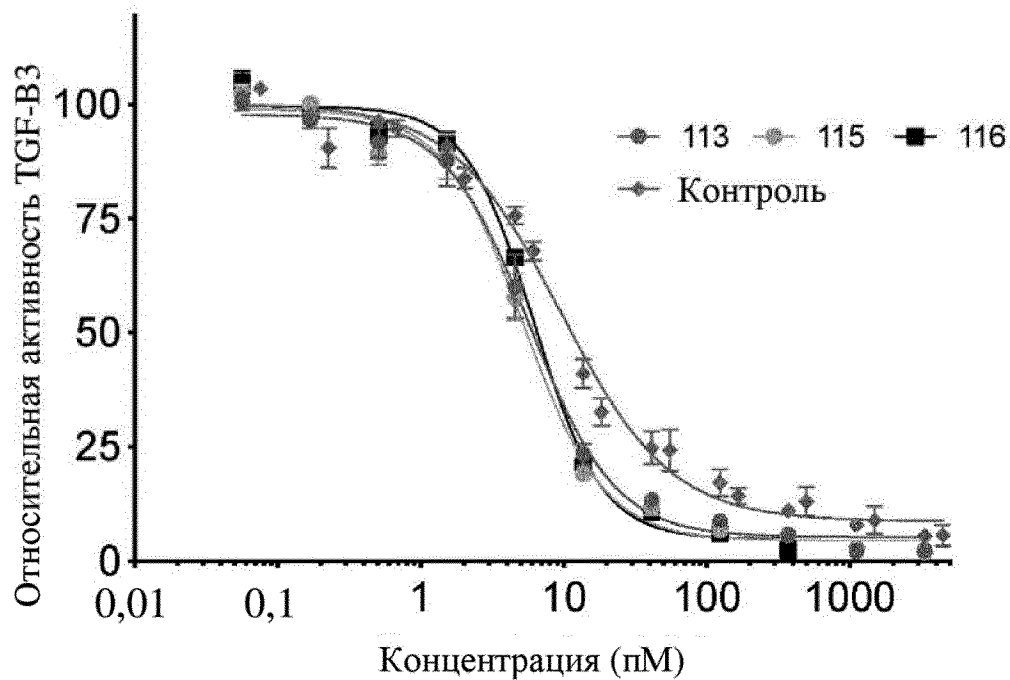
Восстанавливающие
условия

Фиг. 6А



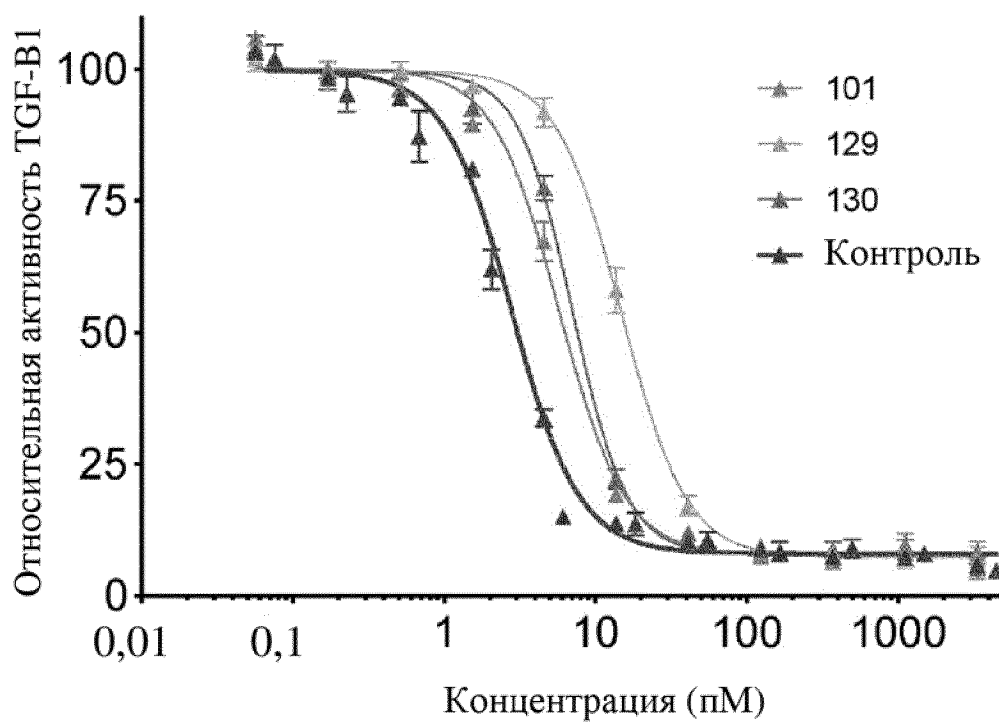
	Контроль	113	115	116
IC ₅₀	2,799	2,098	2,526	2,410

Фиг. 6В



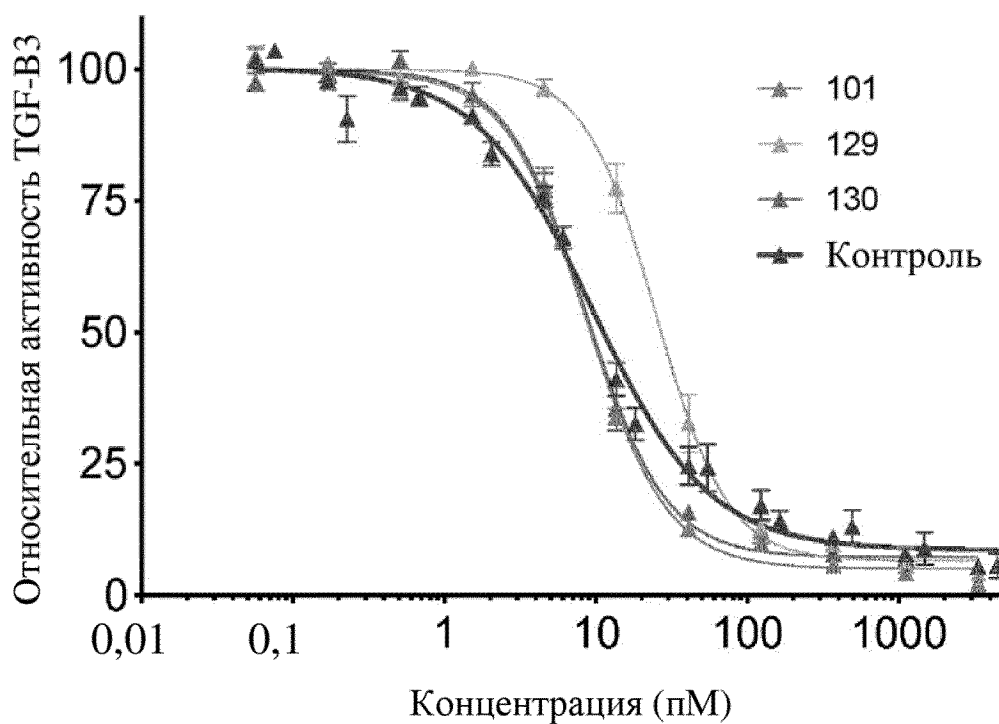
	Контроль	113	115	116
IC ₅₀	9,549	5,791	5,243	6,196

Фиг. 7А



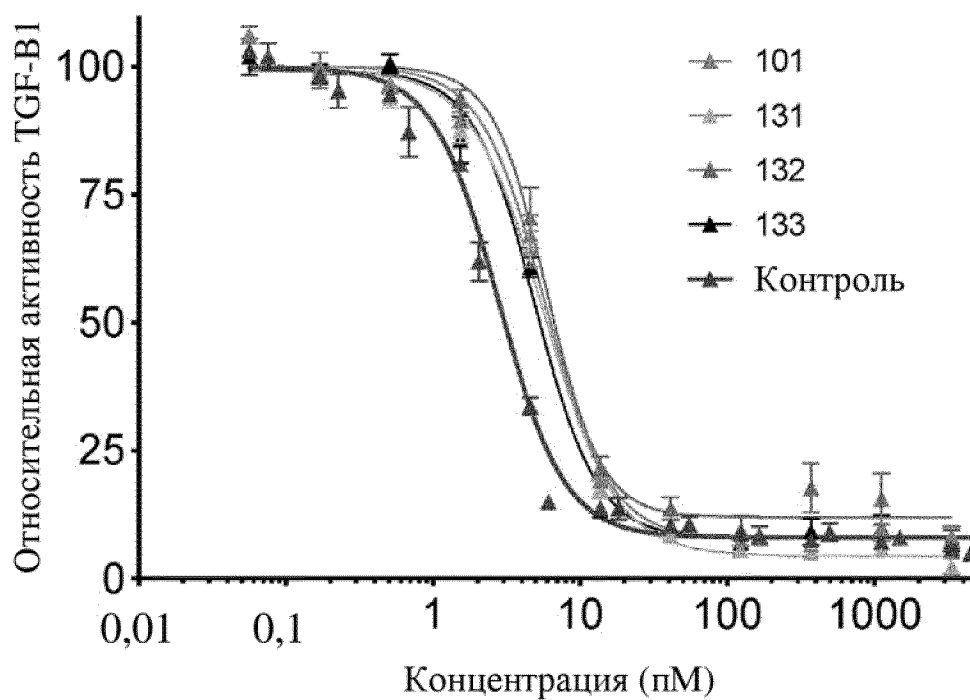
	Контроль	101	129	130
IC50	2,799	5,795	14,94	7,117

Фиг. 7В



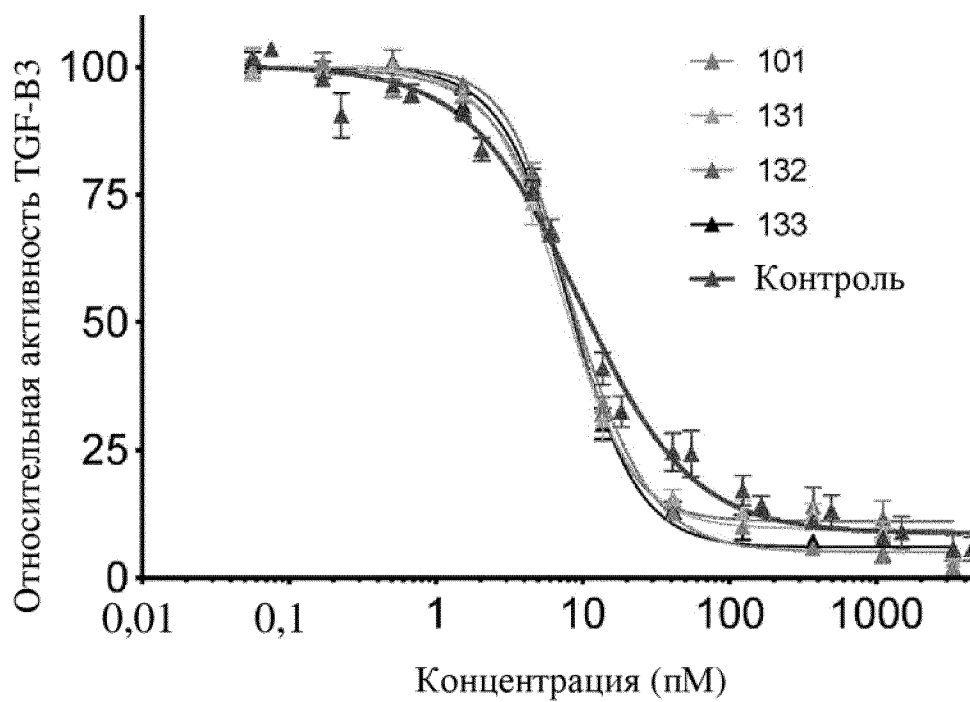
	Контроль	101	129	130
IC50	9,549	8,764	25,24	8,723

Фиг. 8А



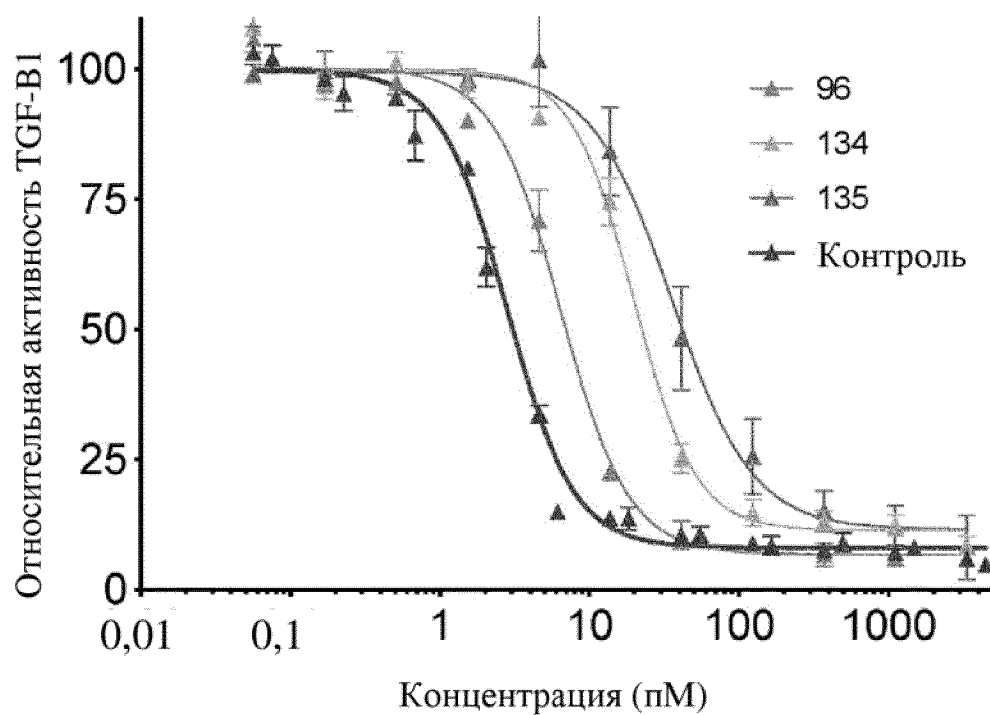
	Контроль	101	131	132	133
IC ₅₀	2,799	5,795	5,697	5,966	4,947

Фиг. 8В



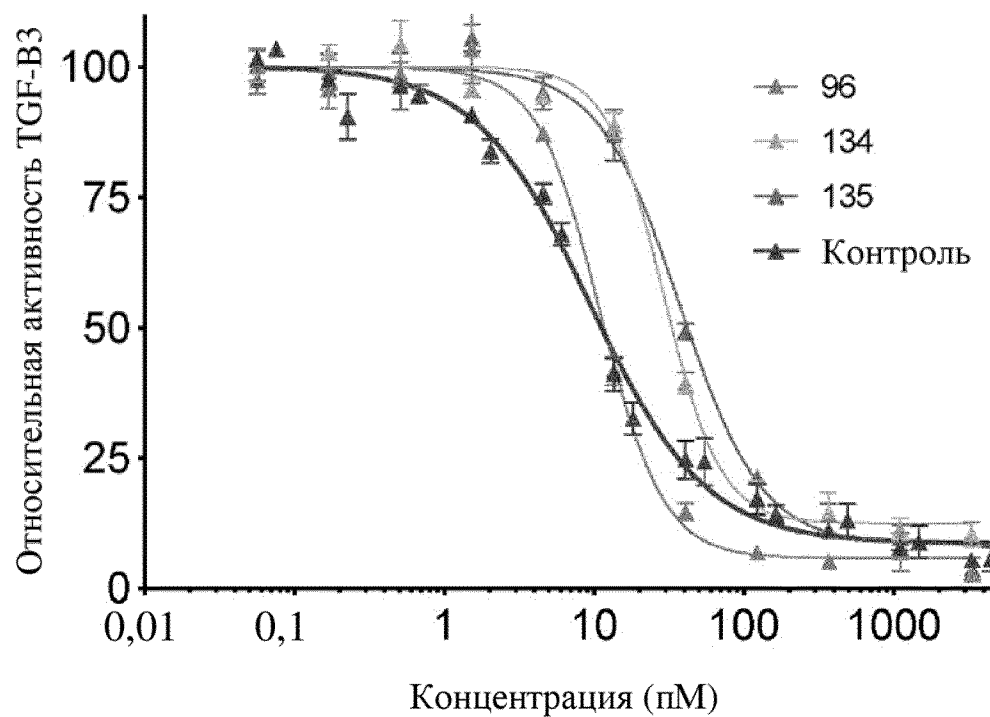
	Контроль	101	131	132	133
IC ₅₀	9,549	8,764	7,366	7,996	8,223

Фиг. 9А



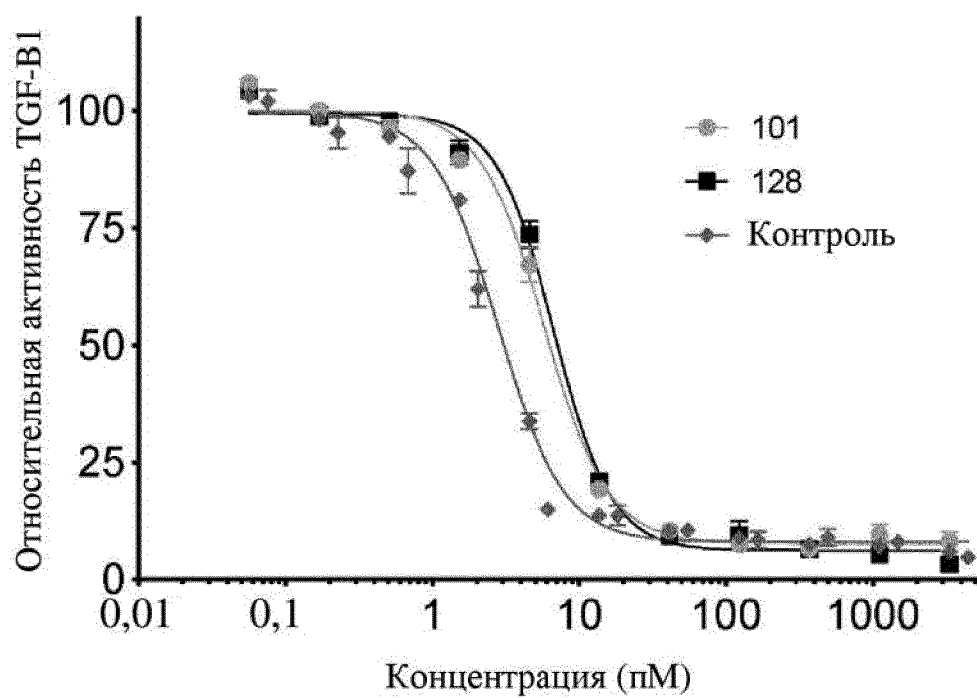
	Контроль	96	134	135
IC50	2,799	6,453	19,91	35,88

Фиг. 9В



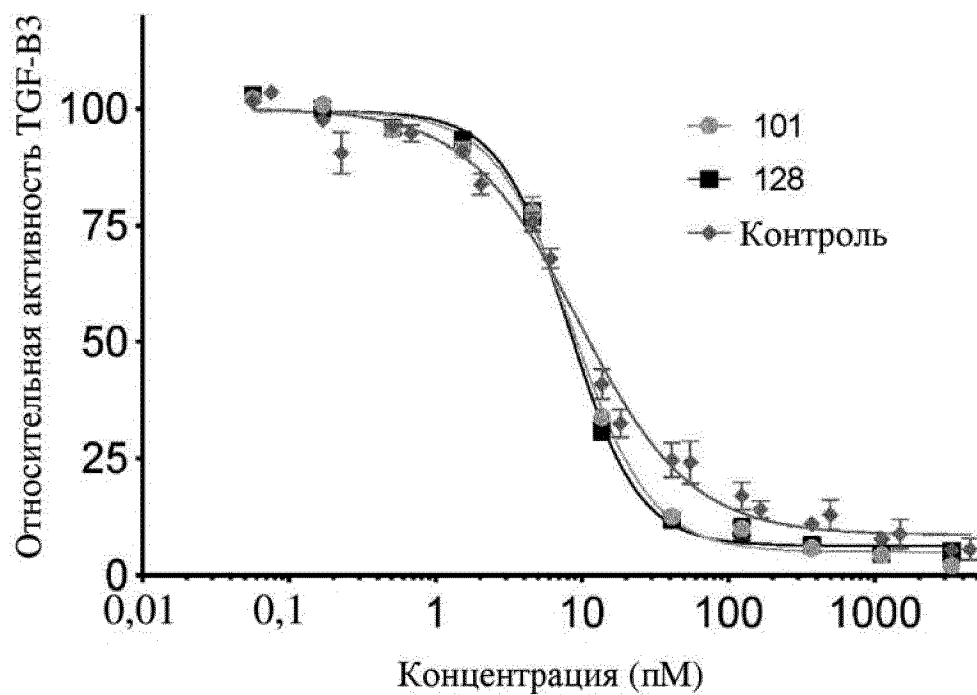
	Контроль	96	134	135
IC50	9,549	11,13	29,51	37,96

Фиг. 10А



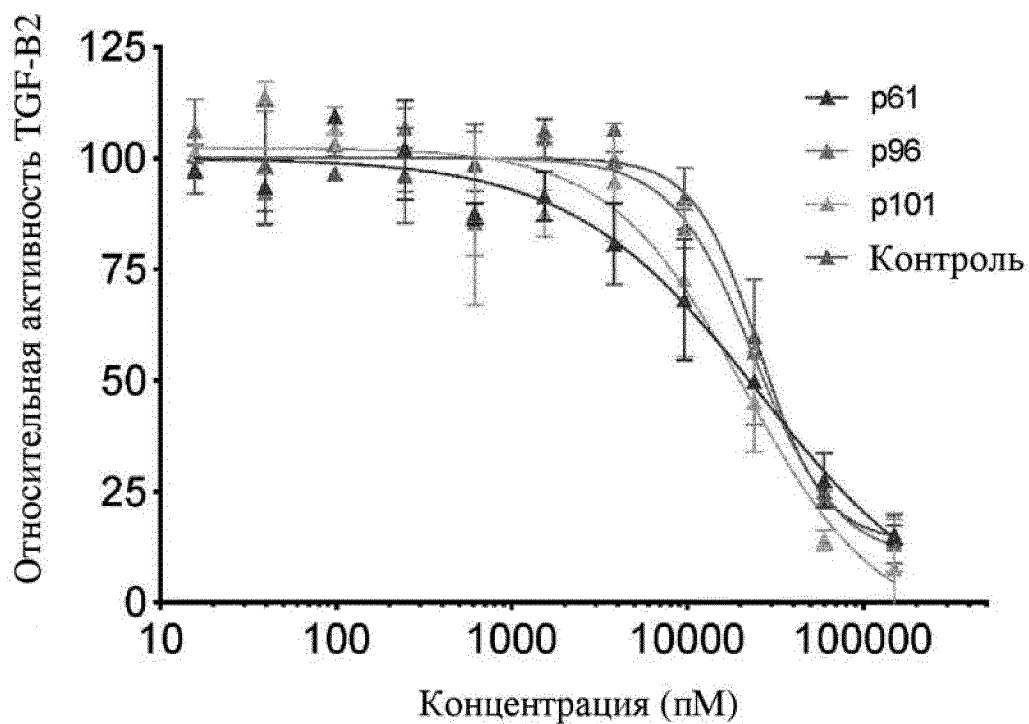
	Контроль	101	128
IC50	2,799	5,795	6,779

Фиг. 10В



	Контроль	101	128
IC50	9,549	8,764	8,225

Фиг. 11



	Контроль	p61	p96	p101
IC50	25631	25783	24204	21076