(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 048751 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.12.28

(21) Номер заявки
201891909

(22) Дата подачи заявки
2017.03.10

(51) Int. Cl. *C07K 16/22* (2006.01)

(54) TGFβ1-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/307,353; 62/443,615; 62/452,866**
(32) **2016.03.11; 2017.01.06; 2017.01.31**
(33) **US**
(43) **2019.02.28**
(86) **PCT/US2017/021972**
(87) **WO 2017/156500 2017.09.14**

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

(72) Изобретатель:
Шурпф Томас, Карвен Грегори Дж., Датта Абхишек, Лонг Кимберли (US)

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

(56) WO-A1-2011102483
N.N.: "Human LAP (TGF-[beta]1) Antibody", 1 January 1985 (1985-01-01), XP055383034, Retrieved from the Internet: URL:https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/af-246-na.pdf [retrieved on 2017-06-20] page 1 - page 2
WO-A2-2014182676
WO-A1-2013134365
WO-A2-2006116002
WO-A1-2015015003
Rui Wang ET AL: "GARP regulates the bioavailability and activation of TGF[beta]", Molecular biology of the cell, 1 March 2012 (2012-03-01), pages 1129-1139, XP55094855, United States DOI: 10.1091/mbc.E11-12-1018 Retrieved from the Internet: URL:http://www.pubmedcentral.nih.gov/artic1erender.fcgi?artid=3302739&tool=pmcentrez&rendertype=abstract the whole document
JOHN C MORRIS ET AL: "Phase I Study of GC1008 (Fresolimumab): A Human Anti-Transforming Growth Factor-Beta (TGF[beta]) Monoclonal Antibody in Patients with Advanced Malignant Melanoma or Renal Cell Carcinoma", PLOS ONE, vol. 9, no. 3, 11 March 2014 (2014-03-11), page e90353, XP55171683, DOI: 10.1371/journal.pone.0090353 the whole document

(57) В настоящем документе раскрываются иммуноглобулины, такие как антитела и их антигенсвязывающие участки, которые специфически связывают комплексы GARP-TGFβ1, LTBP1-TGFβ1, LTBP3-TGFβ1 и/или LRRC33-TGFβ1. Настоящее изобретение также предусматривает способы применения этих иммуноглобулинов, например, для ингибирования активности TGFβ1 и лечения субъектов, страдающих от TGFβ1-ассоциированных нарушений, таких как злокачественная опухоль и фиброз.

048751 B1

048751 B1

Связанные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой США № 62/307353, поданной 11 марта 2016 г.; предварительной заявкой США № 62/443615, поданной 6 января 2017 г.; и предварительной заявкой США № 62/452866, поданной 31 января 2017 г.; полное содержание каждой из которых явным образом включено посредством ссылки во всей их полноте.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Суперсемейство трансформирующего фактора роста β (TGFβ) факторов роста участвует в ряде сигнальных каскадов, которые регулируют различные биологические процессы, в том числе без ограничения ингибирование клеточного роста, тканевой гомеостаз, ремоделирование внеклеточного матрикса (ECM), эндотелиально-мезенхимальный переход (EMT), миграцию и инвазию клеток и иммунномодуляцию/иммуносупрессию, а также мезенхимально-эпителиальный переход. Что касается ремоделирования ECM, то передача сигнала с участием TGFβ может увеличивать популяции фибробластов и отложение ECM (например, коллагена). В иммунной системе лиганд TGFβ модулирует функцию Т-регуляторных клеток и поддержание роста и гомеостаза иммунных клеток-предшественников. В нормальных эпителиальных клетках TGFβ является мощным ингибитором роста и промотором клеточной дифференциации. Однако, поскольку опухоли развиваются и прогрессируют, они часто утрачивают реакцию отрицательного роста по отношению к TGFβ. В таких условиях TGFβ может стать промотором развития опухоли в результате своей способности стимулировать ангиогенез, изменять стромальное окружение и индуцировать локальную и системную иммуносупрессию. По этим и другим причинам TGFβ представлял собой терапевтическую мишень для ряда клинических показаний. Несмотря на большие усилия, прилагаемые к настоящему времени рядом групп, клиническая разработка лекарственного препарата для воздействия на TGFβ представляла собой проблему.

Наблюдения на основе доклинических исследований, в том числе у крыс и собак, выявили определенную токсичность, ассоциированную с ингибированием TGFβ in vivo. Более того, несмотря на то, что к настоящему времени были разработаны некоторые ингибиторы TGFβ, большинство клинических программ, направленных на TGFβ, были прекращены в результате побочных эффектов.

Например, Anderton et al. (Toxicology Pathology, 39: 916-24, 2011) сообщали, что низкомолекулярные ингибиторы рецептора TGFβ I типа (ALK5) индуцировали повреждения сердечных клапанов, характеризующиеся кровоизлиянием, воспалением, дегенерацией и пролиферацией интерстициальных клеток клапанов в доклинической модели на животных. Токсичность наблюдали во всех сердечных клапанах при всех исследуемых дозах. Frazier et al. (Toxicology Pathology, 35: 284-295, 2007) сообщали, что введение низкомолекулярного ингибитора рецептора TGFβ I типа (ALK5) GW788388 индуцировало физарную дисплазию у крыс.

Stauber et al. (J. Clin. Practice 4:3, 2014) сообщали, что хроническое (≥3 месяцев) введение ингибитора киназы рецептора TGFβ I типа, LY2157299, который изучается для лечения определенных злокачественных опухолей, вызывало множественную органную токсичность, в том числе сердечно-сосудистой, пищеварительной, иммунной систем, костной и хрящевой ткани, половой систем и почек у крыс и собак.

Сообщалось, что фрезолимумаб (GC1008), антитело к пан-TGFβ, способное нейтрализовать все изоформы TGFβ человека, индуцирует эпителиальную гиперплазию десны, мочевого пузыря и эпителия носовой раковины после многократных введений в исследованиях с макаками-крабоедами (Lonning et al., Current Pharmaceutical Biotechnology 12: 2176-89, 2011). Аналогично различные сыпи/повреждения кожи, кровоточивость десен и усталость отмечали в клинических испытаниях после введения многократных доз лекарственного средства. Наиболее заметная побочная реакция на фрезолимумаб включает в себя индукцию кератоакантом и/или плоскоклеточных карцином кожи у пациентов-людей со злокачественными опухолями (см., например: Lacouture et al., 2015, Cancer Immunol Immunother, 64: 437-46; Stevenson et al., 2013, Oncolmmunology, 2:8, e26218; и Lonning et al., 2011). Дополнительные данные на основе клинического испытания указывают на то, что это антитело может ускорять прогрессирование опухолей (Stevenson et al., 2013, Oncolmmunology, 2:8, e26218).

Таким образом, необходимы новые способы и композиции для модулирования передачи сигнала с участием TGFβ, которые можно эффективно и безопасно применять для лечения заболеваний и нарушений с участием TGFβ, в том числе, например, злокачественной опухоли, фиброза и воспаления.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее раскрытие относится к избирательной модуляции подгруппы эффектов с участием TGFβ. Настоящее изобретение основано по меньшей мере отчасти на понятии о том, что отсутствие к настоящему времени изоформной специфичности известных антагонистов TGFβ может лежать в основе источника токсичности, ассоциированного с ингибированием TGFβ. Фактически авторы настоящего раскрытия обнаружили, что большинство ингибиторов TGFβ, описанных к настоящему времени, антагонизируют многие или все из изоформ TGFβ. Кроме того, общей тенденцией, описанной в данной области техники, было то, что ингибиторы (такие как антитела к TGFβ), которые антагонизируют многие изоформы TGFβ, являются предпочтительными, вследствие того, что нейтрализация многих изоформ TGFβ

была бы необходимой или предпочтительной для достижения "максимальной терапевтической эффективности" (см., например, Bedinger et al. (2016) MABS 8(2): 389-404).

В отличие от этой общей идеи, авторы настоящего изобретения вместо этого стремились разработать средства, которые обеспечивают изоформно-специфическое ингибирование TGFβ1, в противоположность ингибированию, которое также влияет на TGFβ2 и/или TGFβ3, в целях устранения или заметного снижения токсичности (например, нежелательных явлений, побочных эффектов), наблюдаемой в случае известных антагонистов TGFβ in vivo. Этот новый подход основан по меньшей мере отчасти на понятии о том, что клиническая применимость ингибитора TGFβ может базироваться не только на его эффективности, но также и на его безопасности. Было доказано, что способность точно регулировать мишень с беспрецедентной степенью специфичности может приводить как к эффективности, так и к безопасности/переносимости в клинических условиях.

Соответственно настоящее изобретение включает в себя признание того, что фармацевтические средства, которые ингибируют передачу сигнала с участием TGFβ изоформно-специфическим образом, могут обеспечивать улучшенные профили безопасности по сравнению со средствами, которые влияют на многие изоформы TGFβ. В отличие от этого, ряд известных в данной области техники антагонистов TGFβ приводят к недопустимым уровням токсичности в дозе, которая, как показано, является эффективной in vivo. В таких случаях для избежания токсичности можно применять более низкую дозу, однако она может больше не приводить к достаточной эффективности in vivo при сниженной дозе. Не ограничиваясь определенной теорией, полагают, что такая токсичность по меньшей мере отчасти вызвана отсутствием изоформной специфичности/селективности средства.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом настоящее изобретение предусматривает способы снижения токсичности (например, нежелательных явлений, нежелательных побочных эффектов), ассоциированной с ингибированием TGFβ у субъекта. В соответствии с настоящим изобретением TGFβ1-специфические ингибиторы, такие как таковые, описанные в настоящем документе, характеризуются лучшим профилем безопасности и эффективности, по сравнению со средствами, которые вызывают активность по отношению к мишени более широкого спектра (например, более одной изоформы TGFβ). Таким образом, такие TGFβ1-специфические ингибиторы можно вводить субъектам, нуждающимся в этом, в терапевтически эффективной дозе, не вызывая нежелательных эффектов. Таким образом, такой подход расширил бы диапазон доз, в которых у пациентов может быть достигнута как эффективности, так и безопасность/переносимость. В связи с этим, настоящее изобретение предусматривает способы лечения заболевания, ассоциированного с передачей сигнала с участием TGFβ1, в результате введения субъекту эффективного количества ингибитора TGFβ, который является специфическим или высокоселективным для изоформы TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие TGFβ1-изоформно-селективные или TGFβ1-изоформно-специфические ингибиторы могут представлять собой низкомолекулярные средства или биопрепараты (например, антитела). Применение любых таких ингибиторов для снижения токсичности (например, нежелательных явлений или побочных эффектов), ассоциированной с ингибированием TGFβ у субъекта, охвачено настоящим изобретением. В соответствии с настоящим изобретением эффективное количество находится в диапазоне доз, который обеспечивает как i) эффективность (например, терапевтически благоприятные эффекты); так и ii) безопасность (например, в пределах допустимых уровней нежелательных эффектов или побочных эффектов). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нежелательные эффекты могут включать в себя токсичность для сердечно-сосудистой системы, токсичность для пищеварительной системы, токсичность для иммунной системы, токсичность для костной и хрящевой ткани, токсичность для половой системы и токсичность для почек. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления токсичность для сердечно-сосудистой системы включает в себя без ограничения повреждения сердечных клапанов, например, кровоизлияние, воспаление, дегенерацию и пролиферацию интерстициальных клеток клапанов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нежелательные эффекты могут включать в себя кровотечение. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нежелательные эффекты могут включать в себя повреждения или опухоли кожи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нежелательные эффекты могут включать в себя прогрессирование опухолей.

Соответственно в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение предусматривает изоформно-специфические ингибирующие антитела к TGFβ1 или их антигенсвязывающие фрагменты, характеризующиеся тем, что они селективно ингибируют стадию активации TGFβ1 in vivo, однако не ингибируют стадию активации TGFβ2 и/или TGFβ3. Такие антитела или их фрагменты можно вводить субъектам, которые испытывают эффект от ингибирования TGFβ1, в количестве, эффективном для достижения клинической эффективности, не вызывая недопустимых или непереносимых уровней нежелательных эффектов. Таким образом, настоящее изобретение предусматривает, что TGFβ1-изоформно-специфические ингибиторы могут быть специфически выбраны для соответствия как критериям эффективности, так и критериям безопасности для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с передачей сигнала с участием TGFβ у людей-пациентов.

В соответствии со связанным аспектом настоящее изобретение предусматривает способы получения изоформно-специфических модуляторов TGFβ с улучшенным профилем безопасности (например, сниженной токсичностью in vivo). В таких способах требуется, чтобы средства-кандидаты испытывали и выбирали на предмет изоформной специфичности. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления средства-кандидаты выбирают на предмет специфических активностей в отношении передачи сигнала с участием TGFβ1, но не передачи сигнала с участием TGFβ2 и/или TGFβ3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие средства представляют собой TGFβ1-изоформно-специфические ингибиторы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие средства представляют собой антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются и блокируют активацию TGFβ1, но не TGFβ2 и/или TGFβ3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты не связывают свободный зрелый фактор роста TGFβ1, который не ассоциирован с про/латентным комплексом.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение предусматривает композиции и соответствующие способы получения дополнительного точного регулирования передачи сигнала с участием TGFβ в результате модулирования активации TGFβ контекстно-зависимым образом.

TGFβ участвует в осуществлении ряда клеточных/тканевых эффектов и каждый такой эффект опосредуется отчасти его взаимодействием с так называемыми "представляющими молекулами". Поскольку экспрессия различных представляющих молекул является специфической по отношению к типу клеток или ткани, предполагается, что TGFβ обеспечивает клеточный эффект, в зависимости от его взаимодействия с определенной представляющей молекулой (т.е., "контекста"). Таким образом, в числе прочего, настоящее раскрытие предусматривает моноклональные антитела, которые селективно связывают TGFβ, присутствующий в определенном контексте (например, комплексе, содержащем TGFβ и представляющую молекулу). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие моноклональные антитела специфически связывают по меньшей мере один, по меньшей мере два или по меньшей мере три или четыре из следующих комплексов: i) TGFβ1-GARP; ii) TGFβ1-LRRC33; iii) TGFβ1-LTBP1; и iv) TGFβ1-LTBP3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие моноклональные антитела специфически связывают один из следующих комплексов: i) TGFβ1-GARP; ii) TGFβ1-LRRC33; iii) TGFβ1-LTBP1; и iv) TGFβ1-LTBP3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие моноклональные антитела специфически связывают два из следующих комплексов: i) TGFβ1-GARP; ii) TGFβ1-LRRC33; iii) TGFβ1-LTBP1; и iv) TGFβ1-LTBP3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие моноклональные антитела специфически связывают три из следующих комплексов: i) TGFβ1-GARP; ii) TGFβ1-LRRC33; iii) TGFβ1-LTBP1; и iv) TGFβ1-LTBP3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие моноклональные антитела специфически связывают все из следующих комплексов: i) TGFβ1-GARP; ii) TGFβ1-LRRC33; iii) TGFβ1-LTBP1; и iv) TGFβ1-LTBP3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие моноклональные антитела не связывают зрелый TGFβ1, который представляет собой свободный TGFβ1 (например, не образующий комплекс с представляющей молекулой).

Настоящее раскрытие предусматривает моноклональные антитела, которые связывают малый латентный комплекс (например, "C4S") TGFβ1.

Настоящее раскрытие дополнительно предусматривает антитела, которые селективно целенаправленно воздействуют на TGFβ и модулируют их в определенном контексте. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие моноклональные антитела либо ингибируют либо активируют TGFβ в определенном контексте.

Соответственно настоящее изобретение предусматривает композиции и способы модулирования (активации или ингибирования) подгруппы активностей TGFβ. Таким образом, настоящее изобретение предусматривает моноклональные антитела, которые селективно модулируют подгруппу опосредуемых TGFβ сигнальных путей, не влияя на другие опосредуемые TGFβ сигнальные пути. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления подгруппа опосредуемых TGFβ сигнальных путей включает в себя по меньшей мере один, по меньшей мере два или по меньшей мере три из i) опосредуемых GARP эффектов TGFβ, ii) опосредуемых LRRC33 эффектов TGFβ, iii) опосредуемых LTBP1 эффектов TGFβ, и iv) опосредуемых LTBP3 эффектов TGFβ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие моноклональные антитела специфически модулируют один из следующих опосредуемых TGFβ сигнальных путей, не модулируя другие три пути: i) опосредуемые GARP эффекты TGFβ, ii) опосредуемые LRRC33 эффекты TGFβ, iii) опосредуемые LTBP1 эффекты TGFβ, и iv) опосредуемые LTBP3 эффекты TGFβ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие моноклональные антитела специфически модулируют два из следующих опосредуемых TGFβ сигнальных путей, не модулируя другие два пути: i) опосредуемые GARP эффекты TGFβ, ii) опосредуемые LRRC33 эффекты TGFβ, iii) опосредуемые LTBP1 эффекты TGFβ, и iv) опосредуемые LTBP3 эффекты TGFβ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие моноклональные антитела специфически модулируют три из следую-

щих опосредуемых TGFβ сигнальных путей, не модулируя другой один путь: i) опосредуемые GARP эффекты TGFβ, ii) опосредуемые LRRC33 эффекты TGFβ, iii) опосредуемые LTBP1 эффекты TGFβ, и iv) опосредуемые LTBP3 эффекты TGFβ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие моноклональные антитела специфически модулируют все из следующих опосредуемых TGFβ сигнальных путей: i) опосредуемые GARP эффекты TGFβ, ii) опосредуемые LRRC33 эффекты TGFβ, iii) опосредуемые LTBP1 эффекты TGFβ, и iv) опосредуемые LTBP3 эффекты TGFβ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие моноклональные антитела специфически модулируют опосредуемые GARP эффекты TGFβ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие моноклональные антитела специфически модулируют опосредуемые LRRC33 эффекты TGFβ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие моноклональные антитела специфически модулируют опосредуемые LTBP1 эффекты TGFβ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие моноклональные антитела специфически модулируют опосредуемые LTBP3 эффекты TGFβ. Таким образом, настоящее изобретение предусматривает способы селективного целенаправленного воздействия на активности TGFβ контекстно-зависимым образом.

Аспекты настоящего раскрытия предусматривают фармацевтические композиции и способы лечения заболевания или нарушения у человека-субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое заболевание или нарушение включает в себя состояния, ассоциированные с иммунной регуляцией/дисрегуляцией, состояния, ассоциированные с Т-клеточной регуляцией/дисрегуляцией; состояния, ассоциированные с фиброзным свойством (фиброзом); и/или состояния, ассоциированные с опухолью.

Поскольку антитела или их фрагменты, которые специфически целенаправленно воздействуют на про/латентный комплекс TGFβ, описываемого в настоящем документе, модулируют стадию активации (т.е., высвобождение свободного зрелого фактора роста TGFβ из неактивного латентного предварительно образованного комплекса), в отличие от целенаправленного воздействия на уже высвободившийся свободный зрелый фактор роста, то способ воздействия этих модулирующих средств зависит от источника фактора роста TGFβ в ткани. Таким образом, предполагается, что выявление источника TGFβ, участвующего в контексте заболевания, может способствовать выбору средства, которое эффективно модулирует TGFβ в соответствующем контексте. Например, для лечения фенотипа заболевания, которое включает в себя опосредуемые GARP эффекты TGFβ1, желательно выбирать антитела или их фрагменты, которые специфически целенаправленно воздействуют на комплекс GARP-proTGFβ1. Для лечения фенотипа заболевания, которое включает в себя опосредуемые LRRC33 эффекты TGFβ1, желательно выбирать антитела или их фрагменты, которые специфически целенаправленно воздействуют на комплекс LRRC33-proTGFβ1. Для лечения фенотипа заболевания, которое включает в себя опосредуемые LTBP1 эффекты TGFβ1, желательно выбирать антитела или их фрагменты, которые специфически целенаправленно воздействуют на комплекс LTBP1-proTGFβ1. Для лечения фенотипа заболевания, которое включает в себя опосредуемые LTBP2 эффекты TGFβ1, желательно выбирать антитела или их фрагменты, которые специфически целенаправленно воздействуют на комплекс LTBP2-proTGFβ1. Для лечения фенотипа заболевания, которое включает в себя опосредуемые LTBP3 эффекты TGFβ1, желательно выбирать антитела или их фрагменты, которые специфически целенаправленно воздействуют на комплекс LTBP3-proTGFβ1. Для лечения фенотипа заболевания, которое включает в себя опосредуемые LTBP4 эффекты TGFβ1, желательно выбирать антитела или их фрагменты, которые специфически целенаправленно воздействуют на комплекс LTBP4-proTGFβ1. Для лечения фенотипа заболевания, которое включает в себя эффекты TGFβ1, опосредуемые несколькими (например, двумя или более) контекстами, желательно выбирать антитела или их фрагменты, которые могут целенаправленно воздействовать на соответствующие несколько комплексов представления TGFβ1.

Определенные заболевания ассоциированы с многочисленными биологическими функциями передачи сигнала с участием TGFβ, которые не ограничены одним контекстом функции TGFβ. В таких ситуациях может быть полезным модулировать эффекты TGFβ в нескольких контекстах. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение предусматривает способы целенаправленного воздействия на TGFβ1 и его модулирования изоформно-специфическим образом, а не контекстно-специфическим образом. Такие средства могут обозначаться как "изоформно-специфические контекстно-пермиссивные" модуляторы TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления контекстно-пермиссивные модуляторы TGFβ1 целенаправленно воздействуют на многие контексты (например, многие типы про/латентных комплексов TGFβ1). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления контекстно-пермиссивные модуляторы TGFβ1 целенаправленно воздействуют на все типы про/латентных комплексов TGFβ1 (например, GARP-ассоциированных, LRRC33-ассоциированных, LTBP-ассоциированных и др.) с тем, чтобы охватить все контексты.

В то время как контекстно-пермиссивные модуляторы TGFβ1 способны целенаправленно воздействовать на более чем один тип про/латентных комплексов TGFβ1 (например, с различными представляю-

щими молекулами), в соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие модуляторы могут поддерживать один или несколько контекстов по сравнению с другими. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления контекстно-пермиссивное антитело, которое ингибирует активацию TGFβ1, может предпочтительно ингибировать активацию TGFβ1, опосредуемую одной представляющей молекулой по сравнению с другой представляющей молекулой, даже в случае, если такое антитело способно связываться с обоими типами про/латентных комплексов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое антитело представляет собой моноклональное антитело, которое связывает LTBP-ассоциированный TGFβ1, GARP-ассоциированный TGFβ1 и LRRC33-ассоциированный TGFβ1 и ингибирует их активацию, однако с предпочтительными ингибирующими активностями по отношению к LTBP-ассоциированному TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое антитело представляет собой моноклональное антитело, которое связывает LTBP1-ассоциированный TGFβ1, LTBP3-ассоциированный TGFβ1, GARP-ассоциированный TGFβ1 и LRRC33-ассоциированный TGFβ1 и ингибирует их активацию, однако с предпочтительными ингибирующими активностями по отношению к LTBP1- и LTBP3-ассоциированному TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое антитело представляет собой моноклональное антитело, которое связывает LTBP1-ассоциированный TGFβ1, LTBP3-ассоциированный TGFβ1, GARP-ассоциированный TGFβ1 и LRRC33-ассоциированный TGFβ1 и ингибирует их активацию, однако с предпочтительными ингибирующими активностями по отношению к GARP-ассоциированному TGFβ1 и LRRC33-ассоциированному TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое антитело представляет собой моноклональное антитело, которое связывает GARP-ассоциированный TGFβ1 и LRRC33-ассоциированный TGFβ1 и ингибирует их активацию, однако с предпочтительными ингибирующими активностями по отношению к GARP-ассоциированному TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое антитело представляет собой моноклональное антитело, которое связывает GARP-ассоциированный TGFβ1 и LRRC33-ассоциированный TGFβ1 и ингибирует их активацию, однако с предпочтительными ингибирующими активностями по отношению к LRRC33-ассоциированному TGFβ1.

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением варьирующие степени селективности могут быть получены в целях целенаправленного воздействия на подгруппу эффектов TGFβ. Изоформно-специфические модуляторы TGFβ (которые целенаправленно воздействуют на одну изоформу TGFβ) обеспечивают более высокую селективность, чем модуляторы pan-TGFβ (которые целенаправленно воздействуют на многие или все изоформы TGFβ). Изоформно-специфические контекстно-пермиссивные модуляторы TGFβ (которые целенаправленно воздействуют на многие контексты одной изоффрмы TGFβ) обеспечивают более высокую селективность, чем изоформно-специфические модуляторы. Изофомно-специфические контекстно-специфические модуляторы TGFβ (которые целенаправленно воздействуют на один контекст одной изоформы TGFβ) обеспечивают даже более высокую селективность, чем изоформно-специфические, контекстно-пермиссивные модуляторы.

Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение предусматривает способы лечения заболевания, ассоциированного с передачей сигнала с участием TGFβ, которые предусматривают сначала выявление или подтверждение источника и/или контекста ассоциированного с заболеванием TGFβ, а затем выбор средства, которое специфически целенаправленно воздействуют на определенную подгруппу TGFβ в ткани. В этом отношении предполагается, что такой подход может сохранять нормальную функцию TGFβ, при этом предпочтительно модулировать ассоциированную с заболеванием функцию TGFβ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления для выявления источника/контекста ассоциированного с заболеванием TGFβ можно определять экспрессию TGFβ-представляющей(представляющих) молекулы(молекул) в пораженной ткани. Например, в пораженной ткани может присутствовать как LTBP-ассоциированный латентный комплекс TGFβ1, так и GARP-ассоциированный комплекс TGFβ1, но только последний из двух может экспрессироваться в качестве фенотипа заболевания. В этом сценарии желательно ингибировать GARP-опосредованную передачу сигнала с участием TGFβ1, при этом поддерживать LTBP-опосредованную передачу сигнала с участием TGFβ1 интактной. Определение источника/контекста ассоциированного с заболеванием TGFβ1 можно выполнять при помощи антител, которые специфически связывают латентный комплекс TGFβ1, который включает в себя определенную представляющую молекулу (например, GARP, LRRC33, LTBP и др.). Для лечения состояний, ассоциированных с Т-клеточной регуляцией/дисрегуляцией, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают введение композиции, содержащей эффективное количество моноклонального антитела, которое модулирует опосредуемые GARP эффекты TGFβ у субъекта.

Для лечения состояний, ассоциированных с иммунной регуляцией/дисрегуляцией, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают введение композиции, содержащей эффективное количество моноклонального антитела, которое модулирует опосредуемые GARP эффекты

TGFβ и/или опосредуемые LRRC33 эффекты TGFβ у субъекта.

Для лечения состояний, ассоциированных с фиброзом, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают введение композиции, содержащей эффективное количество моноклонального антитела, которое модулирует опосредуемые LTBP1 эффекты TGFβ и/или опосредуемые LTBP3 эффекты TGFβ у субъекта.

Для лечения состояний, ассоциированных с определенными типами злокачественной опухоли, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают введение композиции, содержащей эффективное количество моноклонального антитела, которое модулирует опосредуемые GARP эффекты TGFβ, опосредуемые LTBP1 эффекты TGFβ и/или опосредуемые LTBP3 эффекты TGFβ у субъекта.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к иммуноглобулинам, таким как антитела или их антигенпредставляющие участки, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1. Антитела или их антигенсвязывающие участки, описываемые в настоящем документе, специфически связываются с эпитопом TGFβ1, который является доступным для связывания антителами или их антигенсвязывающими участками, где TGFβ1 присутствует в комплексе GARP-TGFβ1, комплексе LTBP1-TGFβ1, комплексе LTBP3-TGFβ1 и/или комплексе LRRC33-TGFβ1.

В одном аспекте в настоящем документе предусмотрено выделенное антитело или его антигенсвязывающий участок, который специфически связывается с эпитопом TGFβ1, где эпитоп является доступным для связывания антителом, где TGFβ1 присутствует в двух или более из следующих белковых комплексов: комплексе GARP-TGFβ1, комплексе LTBP1-TGFβ1, комплексе LTBP3-TGFβ1 и комплексе LRRC33-TGFβ1; и где антитело не связывает свободный зрелый TGFβ1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления TGFβ1 представляет собой латентный TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления TGFβ1 представляет собой proTGFβ1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок не связывается с TGFβ2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок не связывается с TGFβ3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок не предотвращает способность TGFβ1 связываться с интегрином.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий участок 3, определяющий комплементарность (CDR3), имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR3, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий участок 2, определяющий комплементарность (CDR2), имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR2, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий участок 1, определяющий комплементарность (CDR1), имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательностью, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 13, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательностью, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 14.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 13, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 14.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR3, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR3, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR2, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR2, имеющий аминокислотную последовательность под

SEQ ID NO: 10. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR1, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательностью, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 15, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательностью, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 16.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 15, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 16.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок ингибирует активацию TGFβ1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок ингибирует высвобождение зрелого TGFβ1 из комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 или комплекса LRRC33-TGFβ1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок имеет константу диссоциации (K_D) с эпитопом TGFβ1, выбранную из группы, состоящей по меньшей мере из приблизительно 10^{-8} M; по меньшей мере из приблизительно 10^{-9} M; по меньшей мере из приблизительно 10^{-10} M; по меньшей мере из приблизительно 10^{-11} M; по меньшей мере из приблизительно 10^{-12} M; и по меньшей мере из приблизительно 10^{-13} M.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит иммуноглобулиновый константный домен тяжелой цепи из константного домена IgM человека, константного домена IgG человека, константного домена IgG_1 человека, константного домена IgG_2 человека, константного домена IgG_2A человека, константного домена IgG_1B человека, константного домена IgG_2 человека, константного домена IgG_3 человека, константного домена IgG_3 человека, константного домена IgG_4 человека, константного домена IgA человека, константного домена IgA_1 человека, константного домена IgA_2 человека, константного домена IgD человека или константного домена IgE человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело его антигенсвязывающий участок содержит иммуноглобулиновый константный домен тяжелой цепи из константного домена IgG_1 человека или константного домена IgG_4 человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело его антигенсвязывающий участок содержит иммуноглобулиновый константный домен тяжелой цепи из константного домена IgG_4 человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит иммуноглобулиновый константный домен тяжелой цепи из константного домена IgG_4 человека, имеющий замену в остове Ser на Pro, которая приводит к образованию IgG_1-подобного шарнира и способствует образованию межцепьевых дисульфидных связей.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок дополнительно содержит иммуноглобулиновый константный домен легкой цепи, содержащий константный домен лямбда-цепи Ig человека или константный домен каппа-цепи Ig человека.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело представляет собой IgG, имеющий четыре полипептидные цепи, которые представляют собой две тяжелые цепи и две легкие цепи.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело, диатело или химерное антитело. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело представляет собой человеческое антитело. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело содержит каркас, имеющий аминокислотную последовательность зародышевой линии человека.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антигенсвязывающий участок представляет собой Fab-фрагмент, $F(ab')_2$-фрагмент, scFab-фрагмент или scFv-фрагмент.

В соответствии с одним аспектом в настоящем документе предусмотрено антитело к TGFβ1 или его антигенсвязывающий участок, который конкурирует за связывание с антителом или его антигенсвязывающим участком, как описано в настоящем документе.

В соответствии с другим аспектом в настоящем документе предусмотрено антитело к TGFβ1 или его антигенсвязывающий участок, который связывается с тем же самым эпитопом, что и антитело или его антигенсвязывающий участок, как описано в настоящем документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий

участок конъюгирован с лекарственным средством или детектируемым фрагментом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок конъюгирован с лекарственным средством или детектируемым фрагментом посредством линкера. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления детектируемый фрагмент выбирают из группы, состоящей из флуоресцентного средства, люминесцентного средства, ферментативного средства и радиоактивного средства.

В соответствии с одним аспектом в настоящем документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий участок, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В соответствии с другим аспектом в настоящем документе предусмотрен способ ингибирования активации TGFβ1, при этом способ предусматривает воздействие на комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 или комплекс LRRC33-TGFβ1 антитела, его антигенсвязывающего участка или фармацевтической композиции, описываемых в настоящем документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок ингибирует высвобождение зрелого TGFβ1 из комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 или комплекса LRRC33-TGFβ1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ осуществляют in vitro. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ осуществляют in vivo.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплекс GARP-TGFβ1 или комплекс LRRC33-TGFβ1 присутствует на внешней поверхностности клетки.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка представляет собой Т-клетку, фибробласт, макрофаг, моноцит, дендритную клетку, антигенпрезентирующую клетку или микроглию.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплекс LTBP1-TGFβ1 или комплекс LTBP3-TGFβ1 связывается с внеклеточным матриксом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления внеклеточный матрикс содержит фибриллин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления внеклеточный матрикс содержит белок, содержащий мотив RGD.

В соответствии с другим аспектом в настоящем документе предусмотрен способ снижения активации TGFβ1 у субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего участка или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, тем самым снижается активация TGFβ1 у субъекта.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления у субъекта имеется фиброз или он подвержен риску наличия его. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления у субъекта имеется мышечная дистрофия. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления у субъекта имеется мышечная дистрофия Дюшенна (DMD). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления у субъекта имеется фиброз печени, фиброз почек или фиброз легких (например, идиопатический фиброз легких) или он подвержен риску наличия их. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления у субъекта имеется злокачественная опухоль или он подвержен риску наличия ее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления у субъекта имеется деменция или он подвержен риску наличия ее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления у субъекта имеется миелофиброз или он подвержен риску развития его.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект дополнительно получает дополнительную терапию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительный препарат выбирают из группы, состоящей из ингибитора миостатина, агониста VEGF, агониста IGF1, агониста FXR, ингибитора CCR2, ингибитора CCR5, двойного ингибитора CCR2/CCR5, лизилоксидаза-подобного 2 ингибитора, ингибитора ASK1, ингибитора ацетил-CoA-карбоксилазы (ACC), ингибитора p38-киназы, пирфенидона, нинтеданиба, ингибитора GDF11 или любой их комбинации.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок снижает супрессорную активность регуляторных Т-клеток.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок не вызывает органную токсичность у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления органная токсичность включает в себя токсичность для сердечно-сосудистой системы, токсичность для пищеварительной системы, иммунотоксичность, токсичность для костной ткани, токсичность для хрящевой ткани, токсичность для половой системы или токсичность для почек.

В соответствии с одним аспектом в настоящем документе предусмотрен способ лечения злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ предусматривает введение субъекту эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего участка или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, тем самым происходит лечение злокачественной опухоли у субъекта.

В соответствии с другим аспектом в настоящем документе предусмотрен способ ослабления опухолевого роста у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ предусматривает введение субъекту

эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего участка или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, тем самым происходит ослабление опухолевого роста у субъекта.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок вводят в комбинации с дополнительным средством или дополнительной терапией. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор контрольных точек. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное средство выбирают из группы, состоящей из антагониста PD-1, антагониста PDL1, слитого белка PD-L1 или PDL2, антагониста CTLA4, агониста GITR, антитела к ICOS, антитела к ICOSL, антитела к B7H3, антитела к B7H4, антитела к TIM3, антитела к LAG3, антитела к OX40, антитела к CD27, антитела к CD70, антитела к CD47, антитела к 41BB, антитела к PD-1, онколитического вируса и ингибитора PARP. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительная терапия представляет собой лучевую терапию, химиотерапию или их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительная терапия представляет собой лучевую терапию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное средство представляет собой химиотерапевтическое средство. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химиотерапевтическим средством является таксол. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное средство представляет собой противовоспалительное средство. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное средство ингибирует процесс рекрутинга моноцитов/макрофагов и/или инфильтрацию тканей. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор активации звездчатых клеток печени. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное средство представляет собой антагонист хемокинового рецептора, например, антагонисты CCR2 и антагонисты CCR5. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такой антагонист хемокинового рецептора является антагонистом с двойной специфичностью, таким как антагонист CCR2/CCR5. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное средство, подлежащее введению в виде комбинированного препарата, является членом суперсемейства TGFβ факторов роста или их регуляторов или содержит его. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое средство выбирают из модуляторов (например, ингибиторов и активаторов) GDF8/миостатина и GDF11. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое средство представляет собой ингибитор передачи сигнала с участием GDF8/миостатина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое средство представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывает про/латентный комплекс миостатина и блокирует активацию миостатина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления моноклональное антитело, которое специфически связывает про/латентный комплекс миостатина и блокирует активацию миостатина, не связывает свободный зрелый миостатин.

В соответствии с еще одним аспектом в настоящем документе предусмотрен способ лечения нарушения функции почек у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ предусматривает введение субъекту эффективного количества антитела, его антигенсвязывающего участка или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, тем самым происходит лечение нарушения функции почек у субъекта.

В соответствии с одним аспектом в настоящем документе предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий участок, как описано в настоящем документе. Также предусмотрены векторы, содержащие нуклеиновую кислоту.

В соответствии с другим аспектом в настоящем документе предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий участок, как описано в настоящем документе. Также предусмотрена клетка, содержащая вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий участок, как описано в настоящем документе.

В соответствии с еще одним аспектом в настоящем документе предусмотрен набор, содержащий антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию, как описано в настоящем документе, и инструкции для его применения.

В соответствии с другим аспектом в настоящем документе предусмотрен способ лечения разрушения мышечных волокон, при этом способ предусматривает стадии введения субъекту, имеющему разрушение мышечных волокон, средства, которое селективно ингибирует TGFβ1 по сравнению с TGFβ2/3, в количестве, эффективном для i) активации репарации мышечных волокон; ii) защиты от повреждения, вызванного сокращением; iii) снижения воспаления в мышцах; и/или iv) снижения фиброза в мышцах. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления это количество не вызывает недопустимого уровня нежелательных эффектов у субъекта.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления разрушение мышечных волокон i) ассоциировано с мышечной дистрофией; или ii) ассоциировано с острым повреждением мышц. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления средство блокирует активацию TGFβ1, но не TGFβ2 или TGFβ3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления средство представляет собой монокло-

нальное антитело. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления моноклональное антитело связывает латентный комплекс GARP-proTGFβ1, латентный комплекс LRRC33-proTGFβ1, латентный комплекс LTBP1-proTGFβ1, латентный комплекс LTBP2-proTGFβ1, латентный комплекс LTBP3-proTGFβ1 и/или латентный комплекс LTBP4-proTGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект дополнительно получает ингибитор миостатина.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ дополнительно предусматривает стадию выявления источника или контекста ассоциированного с заболеванием TGFβ1.

В соответствии с еще одним аспектом в настоящем документе предусмотрен способ получения фармацевтической композиции, которая модулирует передачу сигнала с участием TGFβ, при этом способ предусматривает стадии получения одного или нескольких средств, которые модулируют передачу сигнала с участием по меньшей мере одной изоформы TGFβ; измерения активностей одного или нескольких средств по отношению ко всем изоформам TGFβ; выбора средства, которое является специфическим по отношению к одной изоформе TGFβ; составления в фармацевтическую композицию, содержащую изоформно-специфический модулятор TGFβ и фармацевтически приемлемый наполнитель. Также предусмотрена фармацевтическая композиция, получаемая в результате этого способа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изоформно-специфический модулятор TGFβ представляет собой TGFβ1-специфический модулятор. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления TGFβ1-специфический модулятор представляет собой ингибитор TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изоформно-специфический модулятор TGFβ представляет собой антитело или его фрагмент. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его фрагмент специфически связывает про/латентный комплекс TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его фрагмент не связывает свободный зрелый TGFβ1, который не содержится в про/латентном комплексе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления про/латентный комплекс содержит GARP, LRRC33, LTBP1, LTBP2, LTBP3 или LTBP4.

В соответствии с другим аспектом в настоящем документе предусмотрен способ лечения заболевания, ассоциированного с передачей сигнала с участием TGFβ, при этом способ предусматривает стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, предусматриваемой в настоящем документе, в количестве, эффективном для лечения заболевания, где это количество приводит к статистически значимой клинической эффективности и безопасности при введении популяции пациентов, имеющих заболевание.

В соответствии с еще одним аспектом в настоящем документе предусмотрен ингибитор TGFβ для применения в целях снижения нежелательных эффектов у субъекта, где ингибитор TGFβ является изоформно-селективным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибитор TGFβ представляет собой антитело, которое специфически ингибирует TGFβ1.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлено схематическое изображение, иллюстрирующее TGFβ, связанный в латентном комплексе в тканевом микроокружении.

На фиг. 2A и 2B представлены схематические изображения, иллюстрирующие модуляцию ниши в микроокружении. На фиг. 2A показаны латентный трансформирующий фактор роста бета-связывающие белки (LTBP), представляющие TGFβ в нише фиброзного заболевания и нише заживления раны. На фиг. 2B показано, что белок с преобладающими повторами гликопротеина A (GARP) модулирует активацию TGFβ в нише воспаления.

На фиг. 3 показана платформа экспрессии белка для образования комплекса GARP-TGFβ1 и комплекса LTBP-TGFβ1. В системе экспрессии на основе HEK293 применяется аффинная очистка NiNTA и гель-фильтрация для получения мультимиллиграммных количеств очищенного белка. Показаны схематические изображения proTGFβ1, LTPB1, sGARP дикого типа и proTGFβ1 C4S.

На фиг. 4A и 4B показана очистка комплекса sGARP-proTGFβ1. На фиг. 4A представлена хроматограмма образца и на фиг. 4B показан блот продуктов и схематическое изображение, иллюстрирующее комплекс.

На фиг. 5A и 5B показана очистка комплекса sGARP-LAP TGFβ1. На фиг. 5A представлена хроматограмма образца и на фиг. 5B показан блот продуктов и схематическое изображение, иллюстрирующее комплекс.

На фиг. 6A и 6B показана очистка LTBP1, образующего комплекс с proTGFβ1. На фиг. 6A представлена хроматограмма образца и на фиг. 6B показан блот продуктов и схематическое изображение, иллюстрирующее комплекс. NR означает в невосстанавливающих условиях и R означает в восстанавливающих условиях.

На фиг. 7 представлен график, показывающий, что Ab1 и Ab2 блокируют активацию активности TGFβ1.

На фиг. 8 показан исходный анализ дозозависимого эффекта Ab1 в клетках человека.

На фиг. 9 показаны анализы репортерных клеток CAGA12, иллюстрирующие ингибирование

TGFβ1 под действием Ab1 в клетках человека.

На фиг. 10 показан график, показывающий, что ингибирование комплекса GARP блокирует супрессорную активность Т-регуляторных (Treg) клеток в Т-клетках, выделенных из крови здоровых доноров.

На фиг. 11A-11C показано ингибирование опосредованных интегрином высвобождения TGFβ1 из фибробластов. На фиг. 11A и 11B представлены графики, иллюстрирующие ингибирование эндогенного TGFβ1 как в нормальных фибробластах дермы человека (кружки), нормальных фибробластах легких человека (квадраты), фибробластах легких мыши C57BL/6J (перевернутые треугольники) или фибробластах мышц мыши DBA2/J (кружки), с применением возрастающих концентраций Ab1 (фиг. 11A) или Ab2 (фиг. 11B). На фиг. ПС представлено схематическое изображение системы анализа кокультивирования.

На фиг. 12A и 12B изображено связывание Ab1 (фиг. 12A) или Ab2 (фиг. 12B) с комплексом LRRC33-proTGFβ1.

На фиг. 13A и 13B представлены графики, изображающие ингибирование комплекса GARP-TGFβ1 (фиг. 13A) или комплекса LRRC33-TGFβ1 (фиг. 13B) в клеточных трансфектантах SW480/β6 с применением возрастающих концентраций Ab1 ("Ab1"), Ab2 ("Ab2"), антитела IgG1 изотипического контроля ("изотопический контроль") или контроля носителем ("носитель").

На фиг. 14 представлена столбиковая диаграмма, иллюстрирующая уровни гидроксипролина в ткани почек от мышей, которые перенесли необратимую одностороннюю операцию UUO справа и которым вводили PBS (контроль), 30 мг/кг мышиного контрольного антитела IgG1, 3 мг/кг Ab2 или 30 мг/кг Ab2 внутрибрюшинно (i.p.) перед хирургическим вмешательством (со второго по пятый столбец); или от мышей, которым вводили PBS и которые переносили лапаротомию (контроль плацебо; первый столбец).

На фиг. 15A-15H представлены столбиковые диаграммы, иллюстрирующие относительные уровни мРНК ингибитора активатора плазминогена 1 (PAI-1; фиг. 15A), фактора роста соединительной ткани (CTGF; фиг. 15B), TGFβ1 (фиг. 15C), фибронектина 1 (фиг. 15D), α-гладкомышечного актина (α-SMA; фиг. 15E), моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1; фиг. 15F), альфа 1 цепи коллагена I типа (Col1a1; фиг. 15G) или альфа 1 цепи коллагена III типа (Col3a1; фиг. 15H) в ткани почек от мышей, которые перенесли необратимую одностороннюю операцию UUO справа и которым вводили PBS (контроль), 30 мг/кг мышиного контрольного антитела IgG1, 3 мг/кг Ab2 или 30 мг/кг Ab2 внутрибрюшинно (i.p.) за день до хирургического вмешательства и затем через 1 и 3 дня после хирургического вмешательства (со второго по пятый столбец); или от мышей, которым вводили PBS и которые перенесли лапаратомию (контроль плацебо; первый столбец каждой диаграммы). Эти данные являются обобщением нескольких экспериментов.

На фиг. 16 изображен композитный относительный объем коллагена (CVF) в корковом веществе на основании трех серийных срезов полученной правой почки от мышей, которые окрашивали пикросириусом красным и подвергали количественному гистологическому анализу при помощи сегментации цветового спектра. CVF от мышей, которые перенесли необратимую одностороннюю операцию UUO справа и которым вводили PBS ("Veh"), 30 мг/кг мышиного контрольного антитела IgG1 ("IgG Ctrl"), 3 мг/кг Ab2 ("3 Ab2") или 30 мг/кг Ab2 ("30 Ab2") внутрибрюшинно (i.p.) перед хирургическим вмешательством (со второго по пятый столбец каждой диаграммы); или от мышей, которым вводили PBS и которые перенесли лапаратомию ("плацебо"; первый столбец каждой диаграммы).

На фиг. 17 изображен медианный объем опухоли у мышей C57/BL/6 в сингенной модели карциномы толстой кишки MC38 мышей, которым вводили антитело изотипического контроля IgG1 мыши в комбинации с крысиным контрольным антителом IgG2a (группа 1; контроль); Ab1 в комбинации с крысиным контрольным антителом IgG2a (группа 2); Ab2 в комбинации с крысиным контрольным антителом IgG2a (группа 3); контрольное антитело IgG1 мыши в комбинации с антителом к PD-1 (группа 4); Ab1 в комбинации с антителом к PD-1 (группа 5); Ab2 в комбинации с антителом к PD-1 (группа 6).

На фиг. 18A-18C показана специфичность связывания иллюстративных моноклональных антител. На фиг. 18A показано, что Ab1 и Ab2 специфически связывают proTGFβ1, как измеряется при помощи ELISA, но не proTGFβ2, proTGFβ3 или зрелый TGFβ1. На фиг. 18B представлен пример очищенного LTBP-proTGFβ1, экспрессируемый и очищенный для применения в качестве антигенов для определения специфичности связывания антител. На фиг. 18C представлен пример антитела, которое специфически связывается (как измеряется при помощи ELISA) с комплексом LTBP1-proTGFβ1.

На фиг. 19 представлена кривая выживаемости крыс, обработанных контролем носителем (PBS; "контроль"); 200 мг/кг LY2109761; 300 мг/кг LY2109761; 100 мг/кг антитела к pan-TGFβ ("Ab к pan-TGFβ"); или 100 мг/кг Ab2.

На фиг. 20 представлена масса тела (среднее/стандартное отклонение) крыс, обработанных контролем носителем (PBS; "контроль"); 200 мг/кг LY2109761; 300 мг/кг LY2109761; 100 мг/кг антитела к pan-TGFβ ("Ab к pan-TGFβ"); или 100 мг/кг Ab2.

На фиг. 21A-21C представлена масса тела отдельных крыс, обработанных контролем носителем (PBS; "контроль"), 200 мг/кг LY2109761 или 300 мг/кг LY2109761 (фиг. 21A); контролем носителем (PBS; "контроль") или 100 мг/кг антитела к pan-TGFβ ("Ab к pan-TGFβ"); или контролем носителем

(PBS; "контроль") или 100 мг/кг Ab2.

На фиг. 22A и 22B представлены графики, обозначающие ингибирование комплекса GARP-proTGFβ1 или комплекса LRRC33-proTGFβ1 в клетках SW480/β6, временно трансфицированных плазмидами в целях экспрессии proTGFβ1 и представляющей молекулы (например, GARP или LRRC33) с применением возрастающих концентраций Ab1 (фиг. 22A) или Ab2 (фиг. 22B). IC_{50} (мкг/мл) Ab1 в случае комплекса GARP-TGFβ1 составляла 0,445, а IC_{50} (мкг/мл) Ab1 в случае комплекса LRRC33-TGFβ1 составляла 1,325.

На фиг. 23 представлены микроскопические изображения срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, из сердечных клапанов крыс, обработанных 200 мг/кг LY2109761 (верхняя правая панель); 100 мг/кг антитела к pan-TGFβ ("Ab к pan-TGFβ", нижняя левая панель); 100 мг/кг Ab2 (нижняя правая панель), или необработанного контроля (верхняя левая панель). Примечание. Нижняя правая панель (Ab2) представляет собой косой срез, который окрашен темнее в связи с неравномерной толщиной.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

У млекопитающих семейство трансформирующего фактора роста бета (TGFβ) состоит по меньшей мере из 33 генных продуктов. Они включают костные морфогенетические белки (BMP), активины, факторы роста и дифференцировки (GDF) и три изоформы семейства TGFβ: TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3. Считается, что TGFβ играют основные роли в различных процессах, таких как ингибирование клеточной пролиферации, ремоделирование внеклеточного матрикса (ECM) и иммунный гомеостаз. Важность TGFβ1 для Т-клеточного гомеостаза показана в результате наблюдения того, что $TGF\beta1^{-/-}$ мыши выживают лишь 3-4 недели, претерпевая полиорганную недостаточность в результате массивной иммунной активации (Kulkarni, A.B., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1993. 90(2): p. 770-4; Shull, M.M., et al., Nature, 1992. 359(6397): p. 693-9). Функции TGFβ2 и TGFβ3 менее понятны. Несмотря на то, что три изоформы TGFβ имеют различные временные и пространственные паттерны экспрессии, они передают сигнал посредством одинаковых рецепторов, TGFβRI и TGFβRII, хотя в некоторых случаях, например, в случае передачи сигнала с участием TGFβ2, требуются рецепторы III типа, такие как бетагликан (Feng, X.H. and R. Derynck, Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. 21: p. 659-93; Massague, J., Annu Rev Biochem, 1998. 67: p. 753-91). Индуцируемая лигандом олигомеризация TGFβRI/II активирует фосфорилирование транскрипционных факторов SMAD, приводя к транскрипции целевых генов, таких как Col1a1, Col3a1, ACTA2 и SERPINE1 (Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton, Genes Dev, 2005. 19(23): p. 2783-810). Также были описаны независимые от SMAD пути передачи сигнала с участием TGFβ, например, при злокачественной опухоли или при повреждениях аорты у мышей с синдромом Марфана (Derynck, R. and Y.E. Zhang, Nature, 2003. 425(6958): p. 577-84; Holm, T.M. et al., Science, 2011. 332(6027): p. 358-61).

Биологическая важность пути с участием TGFβ у человека была подтверждена в случае генетических болезней. Болезнь Камурати-Энгельманна вызывает дисплазию костей в результате аутосомно-доминантной мутации в гене TGFB1, приводя к конститутивной активности передачи сигнала с участием TGFβ1 (Janssens, K., et al., J Med Genet, 2006. 43(1): p. 1-11). Пациенты с синдромом Лойса-Дитца несут аутосомно-доминантные мутации в компонентах пути передачи сигнала с участием TGFβ, которые вызывают аневризму аорты, гипертелоризм и расщепление небного язычка (Van Laer, L., H. Dietz, and B. Loeys, Adv Exp Med Biol, 2014. 802: p. 95-105). Поскольку дисрегуляцию пути с участием TGFβ наблюдали при многих заболеваниях, были разработаны и испытаны у пациентов несколько лекарственных средств, которые целенаправленно воздействуют на пути с участием TGFβ, однако они имели ограниченный успех.

Авторы настоящего раскрытия пришли к выводу, что несмотря на то, что все три изоформы TGFβ способны к передаче сигнала посредством одинаковых рецепторов и преобразованию нижележащих эффекторов в клетках, экспрессирующих рецепторы, каждая изоформа TGFβ может порождать различные биологические эффекты in vivo. Более того, авторы настоящего изобретения предполагают, что в некоторых случаях способ, при помощи которого активируется взаимодействие фактора роста и рецептора, может дополнительно обеспечивать специфичность передачи сигнала in vivo. В связи с этим, отмечается, что у ингибиторов TGFβ, описанных в литературе к настоящему времени, отсутствует специфичность, как вкратце обобщено ниже.

Фрезолимумаб, гуманизированное моноклональное антитело, которое связывает и ингибирует все три изоформы TGFβ, испытывали клинически у пациентов с фокально-сегментарным гломерулосклерозом, злокачественной меланомой, почечно-клеточной карциномой и системным склерозом (Rice, L.M. et al., J Clin Invest, 2015. 125(7): p. 2795-807; Trachtman, H., et al., Kidney Int, 2011. 79(11): p. 1236-43; Morris, J.C et al., PLoS One, 2014. 9(3): p. e90353). Другие компании разработали моноклональные антитела к факторам роста TGFβ с варьирующими степенями селективности по отношению к изоформам TGFβ. Такие средства по всей вероятности вызывают токсичность in vivo в результате остаточной активности по отношению к другим членам семейства TGFβ, помимо TGFβ1. По имеющимся сведениям авторов настоящего раскрытия полная специфичность в случае одной изоформы не была достигнута при целенаправленном воздействии на зрелый фактор роста в результате высокой степени идентичности последова-

тельностей между изоформами.

Другие подходы для целенаправленного воздействия на путь с участием TGFβ включают ACE-1332, лигандную ловушку для растворимого TGFβRII-Fc от Acceleron (Yung, L.M., et al., A Am J Respir Crit Care Med, 2016. 194(9): p. 1140-1151) или низкомолекулярные ингибиторы ALK5-киназы, такие как галунисертиб от Lilly. Несмотря на то, что ACE-1332 связывает TGFβ1 и TGFβ3 с одинаково высокой аффинностью (Yung, L.M., et al., Am J Respir Crit Care Med, 2016. 194(9): p. 1140-1151). ALK5-ингибиторы блокируют активность всех факторов роста, которые передают сигнал с участием TGFR1. Значительная токсичность была обнаружена в доклинических исследованиях с применением ALK5-ингибиторов (Anderton, M.J., et al., Toxicol Pathol, 2011. 39(6): p. 916-24; Stauber, A., et al., Clinical Toxicology, 2014. 4(3): p. 1-10), и для поддержания эффективности при одновременном уменьшении нежелательных явлений требуются сложные клинические схемы дозирования (Herbertz, S., et al., Drug Des Devel Ther, 2015. 9: p. 4479-99). Фактически вопрос о специфичности передачи сигнала с участием TGFβ и его возможный эффект на токсичность, наблюдаемую в случае известных ингибиторов TGFβ, не поднимался для большинства, если не во всех, кандидатных лекарственных средств, которые пробовали для блокирования TGFβ. Например, не рассматривалось в какой степени токсичность связана с ингибированием TGFβ1 по сравнению с TGFβ2 и/или TGFβ3. Аналогичным образом, способы активации TGFβ не принимали во внимание при планировании или разработке путей антагонизации передачи сигнала с участием TGFβ.

Современные структурные представления о механизме активации TGFβ1 способствовали тому, что авторы настоящего изобретения предприняли новые более специфические подходы к ингибированию TGFβ (Shi, M., et al., Nature, 2011. 474(7351): p. 343-9). В отличие от других цитокинов, члены суперсемейства TGFβ секретируются не в виде активных факторов роста, а в виде димерных пропротеинов, которые состоят из N-концевого продомена и С-концевого домена фактора роста. Расщепление proTGFβ1 фуринпротеазами отделяет гомодимерный домен фактора роста от его продомена, также обозначаемого как ассоциированный с латентностью пептид (LAP). Однако фактор роста и LAP остаются нековалентно ассоциированными, образуя латентный комплекс, который неспособен связывать свои рецепторы и индуцировать передачу сигнала (фиг. 1). Во время трансляции латентный TGFβ1, также называемый малый латентный комплекс (SLC), связывается с "представляющими молекулами" посредством дисульфидных мостиков, образуя большой латентный комплекс (LLC). Эти молекулы способствуют тому, что proTGFβ1 является представленным в специфических клеточных или тканевых контекстах. Два цистеина возле N-конца латентного TGFβ1 связываются с соответствующим образом расположенными цистеинами на представляющей молекуле. Идентичность представляющей молекулы зависит от окружения и типа клеток, образующих латентный TGFβ1. Например, фибробласты секретируют латентный TGF β1, связанный с TGFβ-связывающими белками (LTBP), который затем ассоциируется с белками во внеклеточном матриксе (ECM) (например, фибронектином, фибриллином 1) со связыванием латентного TGFβ с ECM (Robertson et al., Matrix Biol 47: 44-53 (2015) (фиг. 2A). На поверхности активированных регуляторных Т-клеток латентный TGFβ1 ковалентно связывается с трансмембранным белком GARP (фиг. 2B), и недавно белок, тесно связанный с GARP, LRRC33, был выявлен в качестве представляющей молекулы для TGFβ1 на поверхности моноцитов, макрофагов и микроглии (Wang, R., et al., Mol Biol Cell, 2012. 23(6): p. 1129-39, и T.A. Springer, Int. BMP Conference 2016).

У млекопитающих существуют четыре известных LTBP, LTBP1-4, каждый с несколькими сплайс-вариантами (Robertson, I.B., et al., Matrix Biol, 2015. 47: p. 44-53). LTBP2 представляет собой единственный LTBP, который не ассоциируется с латентным TGFβ (Saharinen, J. and J. Keski-Oja, Mol Biol Cell, 2000. 11(8): p. 2691-704). Несмотря на то, что ассоциация LTBP1 или LTBP3 и латентного TGFβ1 не была в полной мере доказана, роль LTBP4 в представлении TGFβ является менее понятной. Комплекс с LTBP4 и латентным TGFβ1, по-видимому, образуется гораздо менее эффективно, вероятно, в связи с отсутствием нескольких отрицательно заряженных остатков в TGFβ-связывающем домене LTBP4 (Saharinen, J. and J. Keski-Oja, Mol Biol Cell, 2000. 11(8): p. 2691-704; Chen, Y., et al., J Mol Biol, 2005. 345(1): p. 175-86). Как мыши LTBP4S$^{-/-}$, так и пациенты с синдромом Урбана-Рифкина-Дэвиса, которые имеют нуль-мутации в LTBP4, страдают от нарушения сборки эластических волокон (Urban, Z., et al., Am J Hum Genet, 2009. 85(5): p. 593-605; Dabovic, B., et al., J Cell Physiol, 2015. 230(1): p. 226-36). Кроме того, несмотря на то, что у мышей LTBP4S$^{-/-}$ наблюдается септация легких и нарушение эластогенеза, трансгенные мыши с LTBP4, которые не образуют комплекс с латентным TGFβ1, не характеризуются явным фенотипом (Dabovic, B., et al., J Cell Physiol, 2015. 230(1): p. 226-36). Неясно, участвует ли LTBP4 непосредственно в регуляции латентного TGFβ1 в результате функционирования в качестве представляющей молекулы; однако LTBP4 может требоваться для соответствующего образования эластических фибрил в ECM и его потеря косвенно влияет на активацию латентного TGFβ1 вследствие нарушений в ECM.

Ряд исследований дали представление о механизмах активации TGFβ1. Было показано, что три интегрина, αVβ6, αVβ8 и αVβ1, являются основными активаторами латентного TGFβ1 (Reed, N.I. et al., Sci Transl Med, 2015. 7(288): p. 288ra79; Travis, M.A., и D. Sheppard, Annu Rev Immunol, 2014. 32: p. 51-82;

Munger, J.S. et al., Cell, 1999. 96(3): p. 319-28). Интегрины αV связывают последовательность RGD, присутствующую в LAP TGFβ1 и TGFβ1, с высокой аффинностью (Dong, X., et al., Nat Struct Mol Biol, 2014. 21(12): p. 1091-6). Трансгенные мыши с мутацией в участке RGD TGFβ1, которая предупреждает связывание, но не секрецию, интегринов, фенокопируют мышей TGFβ1$^{-/-}$(Yang, Z., et al., J Cell Biol, 2007. 176(6): p. 787-93). Мыши, у которых отсутствуют интегрины β6 и β8, воспроизводят все необходимые фенотипы нокаутированных мышей TGFβ1 и TGFβ3, в том числе полиорганное воспаление и волчью пасть, что подтверждает важную роль этих двух интегринов для активации TGFβ1 при развитии и гомеостазе (Aluwihare, P., et al., J Cell Sci, 2009. 122(Pt 2): p. 227-32). Основным для интегрин-зависимой активации латентного TGFβ1 является ковалентная связь с представляющими молекулами; разрыв дисульфидных связей между GARP и LAP TGFβ1 в результате мутагенеза не нарушает образования комплекса, однако полностью предупреждает активацию TGFβ1 со стороны αVβ6 (Wang, R. et al., Mol Biol Cell, 2012. 23(6): p. 1129-39). Современная структура латентного TGFβ1 показывает, каким образом интегрины способствуют высвобождению активного TGFβ1 из латентного комплекса: ковалентная связь латентного TGFβ1 с его представляющей молекулой заякоривает латентный TGFβ1, либо к ECM посредством LTBP, либо к цитоскелету посредством GARP или LRRC33. Связывание интегринов с последовательностью RGD приводит к зависимому от силы изменению в структуре LAP, что способствует высвобождению и связыванию активного TGFβ1 близлежащими рецепторами (Shi, M., et al., Nature, 2011. 474(7351): p. 343-9). Важность интегрин-зависимой активации TGFβ1 при заболевании была в полной мере доказана. Низкомолекулярный ингибитор αVβ1 защищает от индуцированного блеомицином фиброза легких и индуцированного четыреххлористым углеродом фиброза печени (Reed, N.I., et al., Sci Transl Med, 2015. 7(288): p. 288ra79), а блокада αVβ6 антителом или потеря экспрессии интегрина β6 подавляет индуцированный блеомицином фиброз легких и индуцированный облучением фиброз (Munger, J.S., et al., Cell, 1999. 96(3): p. 319-28); Horan, G.S., et al., Am J Respir Crit Care Med, 2008. 177(1): p. 56-65). Помимо интегринов, предполагаются другие механизмы активации TGFβ1, в том числе при помощи тромбоспондина 1, а также активация протеазами, такими как матричные металлопротеиназы (MMP), катепсин D или калликреин. В то же время большинство из этих исследований выполняли in vitro с применением очищенных белков; существует меньше доказательств роли этих молекул на основании исследований in vivo. Нокаут тромбоспондина 1 воспроизводит некоторые аспекты фенотипа TGFβ1$^{-/-}$ в некоторых тканях, однако не оказывает защитного действия при индуцированном блеомицином фиброзе легких, который, как известно, является TGFβ-зависимым (Ezzie, M.E., et al., Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. 44(4): p. 556-61). Кроме того, нокаут кандидатных протеаз не приводил к фенотипу TGFβ1 (Worthington, J.J., J.E. Klementowicz, and M.A. Travis, Trends Biochem Sci, 2011. 36(1): p. 47-54). Это можно было объяснить избыточным содержанием или тем, что эти механизмы являются основными при конкретных заболеваниях, а не при развитии и гомеостазе.

TGFβ участвовал в ряде биологических процессов, в том числе фиброзе, иммуномодуляции и прогрессировании злокачественной опухоли. TGFβ1 был первым выявленным членом суперсемейства белков TGFβ. Подобно другим членам суперсемейства TGFβ, TGFβ1 и изоформы TGFβ2 и TGFβ3 изначально экспрессировались в качестве неактивных пропротеиновых форм-предшественников (обозначаемых proTGFβ). Белки TGFβ (например, TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3) расщепляются протеолитически пропротеинконвертазами (например, фурином) с образованием латентной формы (обозначаемой латентный TGFβ). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пропротеиновая или латентная форма белка TGFβ (например, TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3) может обозначаться как "про/латентный белок TGFβ". TGFβ1 может быть представлен другим молекулам в комплексе с несколькими молекулами, например, GARP (с образованием комплекса GARP-TGFβ1), LRRC33 (с образованием комплекса LRRC33-TGFβ1), LTBP1 (с образованием комплекса LTBP1-TGFβ1) и/или LTBP3 (с образованием комплекса LTBP3-TGFβ1). TGFβ1, присутствующий в этих комплексах, может находиться как в латентной форме (латентный TGFβ1), так и в форме предшественника (proTGFβ1).

Настоящее изобретение направлено на иммуноглобулины, например, антитела или их антигенсвязывающие участки, которые специфически связываются с (1) белком TGFβ (например, про/латентным TGFβ1, про/латентным TGFβ2 и про/латентным TGFβ3) в комплексе с белком GARP, (2) белком TGFβ в комплексе с белком LTBP (например, LTBP1 или LTBP3), и/или (3) белком TGFβ в комплексе с белком LRRC33. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки, раскрываемые в настоящем документе, связываются с эпитопом TGFβ1, который является доступным для связывания антителом или его антигенсвязывающими участками, где TGFβ1 присутствует в комплексе GARP-TGFβ1, комплексе LTBP1-TGFβ1, комплексе LTBP3-TGFβ1 и/или комплексе LRRC33-TGFβ1. Не ограничиваясь какой-либо определенной теорией, полагают, что способность антител и их антигенсвязывающих участков связываться с белком TGFβ (например, TGFβ1), который находится в комплексе с белком GARP, белком LTBP и/или белком LRRC33, способствует целенаправленному воздействию белка TGFβ контекстно-независимым образом и может особенно подходить для тера-

певтических приложений.

Определения.

Для более легкого понимания настоящего раскрытия сначала определяются определенные термины. Эти определения необходимо трактовать с точки зрения оставшейся части настоящего раскрытия и как понимается специалистом в данной области. Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, как и обычно понимаемые специалистом в данной области. Дополнительные определения изложены по всему подробному описанию.

Используемый в настоящем документе термин "специфическое связывание" или "специфически связывает" означает, что взаимодействие антитела или его антигенсвязывающего участка с антигеном зависит от присутствия определенной структуры (например, антигенная детерминанта или эпитоп). Например, антитело или его антигенсвязывающий участок связывается с конкретным белком, а не с белками в целом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок специфически связывается с мишенью, например, TGFβ1, в случае, если антитело имеет K_D по отношению к мишени, составляющую по меньшей мере приблизительно 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М или менее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления термин "специфическое связывание с эпитопом TGFβ1", "специфически связывается с эпитопом TGFβ1", "специфическое связывание с TGFβ1" или "специфически связывается с TGFβ1", как используется в настоящем документе, относится к антителу или его антигенсвязывающему участку, который связывается с TGFβ1 и имеет константу диссоциации (K_D), составляющую $1{,}0\times10^{-7}$ М или менее, как определяется при помощи поверхностного плазмонного резонанса. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок может специфически связываться как с человеческими, так и с отличными от человеческих ортологами (например, мышиными) TGFβ1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аффинность связывания антитела или его антигенсвязывающего участка с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1 определяются при помощи анализа Octet. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления анализ Octet представляет собой анализ, в котором определяют один или несколько кинетических параметров, указывающих на связывание между антителом и антигеном. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления система Octet® (ForteBio, Менло-Парк, Калифорния) применяется для определения аффинности связывания антитела или его антигенсвязывающего участка с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1. Например, аффинности связывания антител можно определять при помощи системы анализа fortéBio Octet QK^e на основе тест-полоски, не содержащей меток, в которой используется интерферометрия биослоя. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антигены иммобилизируют к биосенсорам (например, покрытых стрептавидином биосенсорам), а антитела и комплексы (например, биотинилированные комплексы GARP-TGFβ1 и биотинилированные комплексы LTBP-TGFβ1) присутствуют в растворе в высокой концентрации (50 мкг/мл) в целях измерения связывающих взаимодействий. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аффинность связывания антитела или его антигенсвязывающего участка с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1 определяются при помощи протокола, изложенного в табл. 6.

Как используется в настоящем документе, термин "комплекс GARP-TGFβ1" относится к белковому комплексу, содержащему пропротеиновую форму или латентную форму белка, являющегося трансформирующим фактором роста β1 (TGFβ1), и белок с преобладающими повторами гликопротеина A (GARP). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пропротеиновая форма или латентная форма белка TGFβ1 может обозначаться как "про/латентный белок TGFβ1". В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплекс GARP-TGFβ1 содержит GARP, ковалентно связанный с про/латентным TGFβ1 посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В соответствии с другими вариантами осуществления комплекс GARP-TGFβ1 содержит GARP, нековалентно связанный с про/латентным TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплекс GARP-TGFβ1 представляет собой встречающийся в природе комплекс, например, комплекс GARP-TGFβ1 в клетке. Иллюстративный комплекс GARP-TGFβ1 показан на фиг. 3.

Как используется в настоящем документе, термин "комплекс LTBP1-TGFβ1" относится к белковому комплексу, содержащему пропротеиновую форму или латентную форму белка, представляющего собой трансформирующий фактор роста β1 (TGFβ1), и латентный TGF-бета-связывающий белок 1 (LTBP1). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплекс LTBP1-TGFβ1 содержит LTBP1, ковалентно связанный с про/латентным TGFβ1 посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В соответствии с другими вариантами осуществления комплекс LTBP1-TGFβ1 содержит LTBP1, нековалентно связанный с про/латентным TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплекс LTBP1-TGFβ1 представляет собой встречающийся в природе комплекс, например, комплекс LTBP1-TGFβ1 в клетке. Иллюстративный комплекс LTBP1-TGFβ1 показан на фиг. 3.

Как используется в настоящем документе, термин "комплекс LTBP3-TGFβ1" относится к белковому комплексу, содержащему пропротеиновую форму или латентную форму белка, представляющего собой трансформирующий фактор роста β1 (TGFβ1), и латентный TGF-бета-связывающий белок 1 (LTBP3). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплекс LTBP3-TGFβ1 содержит LTBP3, ковалентно связанный с про/латентным TGFβ1 посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В соответствии с другими вариантами осуществления комплекс LTBP3-TGFβ1 содержит LTBP3, нековалентно связанный с про/латентным TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплекс LTBP3-TGFβ1 представляет собой встречающийся в природе комплекс, например, комплекс LTBP3-TGFβ1 в клетке. Иллюстративный комплекс LTBP3-TGFβ1 показан на фиг. 3.

Как используется в настоящем документе, термин "комплекс LRRC33-TGFβ1" относится к комплексу между пропротеиновой формой или латентной формой белка, являющегося трансформирующим фактором роста β1 (TGFβ1), и белком 33, содержащим богатые лейцином повторы (LRRC33; также известным как отрицательный регулятор активных форм кислорода, или NRROS). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплекс LRRC33-TGFβ1 содержит LRRC33, ковалентно связанный с про/латентным TGFβ1 посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В соответствии с другими вариантами осуществления комплекс LRRC33-TGFβ1 содержит LRRC33, нековалентно связанный с про/латентным TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплекс LRRC33-TGFβ1 представляет собой встречающийся в природе комплекс, например, комплекс LRRC33-TGFβ1 в клетке.

Термин "антитело" относится к иммуноглобулиновой молекуле, которая специфически связывается с целевым антигеном, и включает в себя, например, химерные, гуманизированные, полностью человеческие и биспецифические антитела. Интактное антитело будет, как правило, содержать по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, однако в некоторых вариантах осуществления может включать меньше цепей, например, как антитела, встречающиеся в природе у верблюдовых, которые могут содержать только тяжелые цепи. Антитела могут происходить полностью из одного источника или могут быть "химерными", т.е., различные участки антитела могут происходить из двух различных антител. Антитела или их антигенсвязывающие участки могут быть получены в гибридомах при помощи методик рекомбинантной ДНК или при помощи ферментативного или химического расщепления интактных антител. Термин "антитела", как используется в настоящем документе, включает в себя моноклональные антитела, биспецифические антитела, миниантитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда обозначаемые в настоящем документе как "антитела-миметики"), химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слияния антител (иногда обозначаемые в настоящем документе как "конъюгаты антител") соответственно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления термин также охватывает пептитела.

Встречающиеся в природе структурные единицы антител обычно содержат тетрамер. Каждый такой тетрамер обычно состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну полноразмерную "легкую" (в соответствии с определенными вариантами осуществления приблизительно 25 кДа) и одну полноразмерную "тяжелую" цепь (в соответствии с определенными вариантами осуществления приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевой участок каждой цепи обычно включает в себя вариабельный участок от приблизительно 100 до 110 или более аминокислот, который обычно отвечает за распознавание антигенов. Карбоксиконцевой участок каждой цепи обычно определяет константный участок, который может отвечать за эффекторную функцию. Легкие цепи человеческих антител обычно классифицируют как легкие каппа- и лямбда-цепи. Тяжелые цепи обычно классифицируют как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, и они определяют изотип антитела. Антитело может быть любого типа (например, IgM, IgD, IgG, IgA, IgY и IgE) и класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM1, IgM2, IgA1 и IgA2). В полноразмерных легких и тяжелых цепях вариабельные и константные участки обычно соединены при помощи "J"-участка, состоящего приблизительно из 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает "D"-участок, состоящий приблизительно из 10 или более аминокислот (см., например, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y (1989)) (включено посредством ссылки во всей своей полноте)). Вариабельные участки каждой пары легкой/тяжелой цепи обычно образуют антигенсвязывающий участок.

Вариабельные участки обычно характеризуются одинаковой общей структурой относительно консервативных каркасных участков (FR), соединенных при помощи гипервариабельных участков, также называемых участками, определяющими комплементарность, или CDR. CDR из двух цепей каждой пары обычно выравнивают при помощи каркасных участков, которые могут способствовать связыванию со специфическим эпитопом. В направлении от N-конца к C-концу вариабельные участки как легких, так и тяжелых цепей обычно содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Распределение аминокислот к каждому домену обычно происходит в соответствии с определениями последовательностей белков по Кабату, представляющих иммунологический интерес (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 и 1991)), или в соответствии с Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342: 878-883. CDR легкой цепи могут также обозначаться как CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3,

а CDR тяжелой цепи могут также обозначаться как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело может содержать незначительное число аминокислотных делеций от карбоконца тяжелой(тяжелых) цепи(цепей). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело содержит тяжелую цепь, имеющую 1-5 аминокислотных делеций в карбоксиконце тяжелой цепи. В соответствии с определенными вариантами осуществления окончательное определение CDR и выявление остатков, содержащих связывающий участок антитела, выполняется в результате определения структуры антитела и/или определения структуры комплекса "антитело-лиганд". В соответствии с определенными вариантами осуществления это можно выполнить в результате любой из множества методик, известных специалистам в данной области, таких как рентгенокристаллография. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления различные способы анализа можно использовать для выявления или аппроксимации участков CDR. Примеры таких способов включают в себя без ограничения определение по Кабату, определение по Чотиа, определение в соответствии с AbM и контактное определение.

"Функциональный антигенсвязывающий участок" связывающего белка представляет собой таковой, который может связываться с мишенью, антигеном или лигандом. Антигенсвязывающая аффинность антигенсвязывающего участка не обязательно является такой же сильной, как и у родительского связывающего белка, из которого антигенсвязывающий участок происходит, однако способность связывать антиген должна подлежать измерению при помощи любого из множества способов, известных для оценки связывания связывающего белка с антигеном. Кроме того, антигенсвязывающая аффинность каждого из антигенсвязывающих участков мультиспецифического связывающего белка в настоящем документе не должна быть одинаковой в количественном отношении.

Термин "вариабельный участок" или "вариабельный домен" относится к участку легкой и/или тяжелой цепей антитела, обычно включающему примерно аминоконцевые 120-130 аминокислот в тяжелой цепи и приблизительно 100-110 аминоконцевых аминокислот в легкой цепи. В соответствии с определенными вариантами осуществления вариабельные участки различных антител отличаются в значительной степени по аминокислотной последовательности даже среди антител одного и того же вида. Вариабельный участок антитела обычно определяет специфичность определенного антитела по отношению к его мишени.

Иммуноглобулиновый константный домен относится к константному домену тяжелой или легкой цепи. В данной области известны аминокислотные последовательности константных доменов тяжелой цепи и легкой цепи IgG человека.

Термин "конкурировать" при использовании в контексте антигенсвязывающих белков (например, антитела или его антигенсвязывающего участка), которые конкурируют за один и тот же эпитоп, означает конкуренцию между антигенсвязывающими белками, как определяется при помощи анализа, в котором антигенсвязываюий белок, подлежащий исследованию, предупреждает или ингибирует (например, снижает) специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка с распространенным антигеном (например, TGFβ1 или его фрагментом). Многочисленные типы анализов конкурентного связывания можно использовать для определения того, конкурирует ли один антигенсвязывающий белок с другим, например: твердофазный радиоиммунологический анализ (RIA) с прямой или непрямой детекцией, твердофазный иммуноферментный анализ (EIA) с прямой или непрямой детекцией, сэндвич-анализ определения конкурирования; твердофазный EIA с прямой детекцией с применением биотина-авидина; твердофазный анализ с прямой детекцией с применением метки и твердофазный сэндвич-анализ с прямой детекцией с применением метки. Обычно в случае, если конкурирующий антигенсвязывающий белок присутствует в избытке, он будет ингибировать (например, уменьшать) специфичное связывание эталонного антигенсвязывающего белка с распространенным антигеном по меньшей мере на 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или 75% или более. В некоторых случаях связывание ингибируется по меньшей мере на 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97% или 97% или более.

Термин "антиген" относится к молекулярной структуре, которая предусматривает эпитоп, например, молекуле или участку молекулы или комплексу молекул или участков молекул, способных связываться селективным связывающим средством, таким как антигенсвязывающий белок (в том числе, например, антитело). Таким образом, селективное связывающее средство может специфически связываться с антигеном, который образуется двумя или несколькими компонентами в комплексе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антиген способен применяться у животного для получения антител, способных связываться с этим антигеном. Антиген может обладать одним или несколькими эпитопами, которые способны взаимодействовать с различными антигенсвязывающими белками, например, антителами.

Как используется в данном документе, термин "CDR" относится к участку, определяющему комплементарность, в вариабельных последовательностях антител. Существует три CDR в каждом вариабельном участке тяжелой цепи и легкой цепи, которые обозначаются CDR1, CDR2 и CDR3 в случае каждого из вариабельных участков. Термин "набор CDR", как используется в настоящем документе, относится к группе трех CDR, которые встречаются в одном вариабельном участке, который может связывать антиген. Точные границы этих CDR были определены различным образом в соответствии с различными

системами. Система, описанная последовательностями белков по Кабату, представляющих иммунологический интерес (Kabat et al. (1987; 1991) (National Institutes of Health, Bethesda, Md.), не только предусматривает однозначную систему нумерации остатков, применимую к любому вариабельному участку антитела, но также предусматривает точные границы, определяющие эти три CDR. Эти CDR можно обозначать как CDR по Кабату. Chothia с коллегами (Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; и Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883) обнаружили, что определенные субфрагменты в CDR по Кабату принимают почти идентичные конформации пептидных каркасов, несмотря на наличие большого разнообразия на уровне аминокислотной последовательности. Эти субфрагменты были обозначены как L1, L2 и L3 или H1, H2 и H3, где "L" и "H" обозначает участки легкой цепи и тяжелой цепи соответственно. Эти участки могут называться как CDR по Чотиа, границы которых перекрывают CDR по Кабату. Другие границы, определяющие CDR, перекрывающиеся с CDR по Кабату, были описаны Padlan (1995) FASEB J. 9: 133-139 и MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5): 732-45. Еще одни определения границ CDR могут строго не соответствовать одной из систем настоящего документа, однако, несмотря на это, будут перекрывать CDR по Кабату, хотя они могут быть укорочены или удлинены с учетом прогностических или экспериментальных результатов, когда определенные остатки или группы остатков или даже все CDR значительно не влияют на связывание антигенов. В способах, используемых в настоящем документе, могут применять CDR, определенные в соответствии с любой из этих систем, несмотря на то, что в определенных вариантах осуществления применяют CDR, определенные по Кабату или по Чотиа.

Термины "кристаллический" и "кристаллизованный", как используется в настоящем документе, относится к связывающему белку (например, антителу) или его антигенсвязывающему участку, который существует в форме кристалла. Кристаллы представляют собой одну из форм твердого состояния вещества, которая отличается от других форм, например, аморфного твердого состояния или жидкокристаллического состояния. Кристаллы состоят из упорядоченных повторяющихся пространственных массивов атомов, ионов, молекул (например, белков, таких как антитела) или молекулярных ансамблей (например, комплексов антиген/антитело). Такие пространственные массивы упорядочены в соответствии с определенными математическими взаимосвязями, которые общеизвестны в данной области. Фундаментальная единица или строительный блок, который повторяется в кристалле, называется асимметричной единицей. Повторение асимметричной единицы в структуре, которая придает определенную четко выраженную кристаллографическую симметрию, приводит к образованию "элементарной ячейки" кристалла. Повторение элементарной ячейки в результате упорядоченных трансляций во всех трех направлениях приводит к образованию кристалла. См. Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999).

Термин "эпитоп" включает в себя любую молекулярную детерминанту (например, полипептидную детерминанту), которая специфически связывается со связывающим средством, иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. В соответствии с определенными вариантами осуществления детерминанты эпитопов включают в себя химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорил или сульфонил, и, в соответствии с определенными вариантами осуществления могут иметь специфические характеристики пространственных структур, и/или специфические характеристики заряда. Эпитоп представляет собой участок антигена, который связывается связывающим белком. Таким образом, эпитоп состоит из аминокислотных остатков антигена (или его фрагмента), который, как известно, связывается с комплементарным участком на конкретном связывающем партнере. Антигенный фрагмент может содержать более одного эпитопа. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело специфически связывает антиген при распознавании своего целевого антигена в сложной смеси белков и/или макромолекул. Например, считается, что антитела "связывают одинаковый эпитоп", если антитела перекрестно конкурируют (одно предупреждает связывающий или модулирующий эффект другого). Помимо того, структурные определения эпитопов (перекрывающиеся, аналогичные, идентичные) являются информативными, однако функциональные определения часто являются более уместными, поскольку они охватывают структурные (связывание) и функциональные (модуляция, конкурирование) параметры.

Термин "лечить" и "лечение" включает в себя терапевтические виды лечения, профилактические виды лечения и виды практического применения, в которых снижается риск того, что у субъекта будет развиваться нарушение, или другой фактор риска. Лечение не требует полного излечения от нарушения и охватывает варианты осуществления, в которых снижаются симптомы или лежащие в основе факторы риска.

Стандартные методики можно применять в случае рекомбинантной ДНК, олигонуклеотидного синтеза и культивирования тканей и трансформации (например, электропорацию, липофекцию). Ферментативные реакции и методики очистки можно осуществлять в соответствии с описаниями производителей или как обычно выполняют в данной области или как описано в настоящем документе. Вышеизложенные методики и процедуры можно, как правило, осуществлять в соответствии со стандартными способами, общеизвестными в данной области, и как описано в различных общих и более конкретных источниках, которые упомянуты и описаны по всему настоящему описанию. См., например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

(1989)), который включен в настоящий документ при помощи ссылки для любой цели. Если не предусмотрены конкретные определения, номенклатура, используемая в связи с аналитической химией, синтетической органической химией и медицинской и фармацевтической химией и лабораторные процедуры и методики, описываемые в настоящем документе, общеизвестны и широко распространены в данной области. Стандартные методики можно применять для химического синтеза, химического анализа, фармацевтического получения, составления, доставки и лечения пациентов.

Термины "антигенсвязывающий участок" или "антигенсвязывающий фрагмент", как используется в настоящем документе, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, TGFβ1). Антигенсвязывающие участки включают без ограничения любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антигенсвязывающий участок антитела может быть получен, например, из молекул полноразмерных антител при помощи любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методики генной инженерии, в том числе манипуляция с ДНК, кодирующей вариабельные и необязательно константные домены антител, и ее экспрессию. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих участков включают: (i) Fab-фрагменты, моновалентный фрагмент, состоящий из VL-, VH-, CL- и CH1-доменов; (ii) $F(ab')_2$-фрагменты, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd-фрагменты, состоящие из VH- и CH1-доменов; (iv) Fv-фрагменты, состоящие из VL- и VH-доменов одного плеча антитела, (v) одноцепочечные Fv (scFv)-молекулы (см., например, Bird et al. (1988) SCIENCE 242:423-426; и Huston et al. (1988) PROC. NAT'L. ACAD. SCI. USA 85:5879-5883); (vi) dAb-фрагменты (см., например, Ward et al. (1989) NATURE 341: 544-546); и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельные участок антитела (например, выделенный участок, определяющий комплементарность (CDR)). Также охвачены другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела. Термин антигенсвязывающий участок антитела включает в себя "одноцепочечный Fab-фрагмент", иначе известный как "scFab", содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела (VH), константный домен 1 антитела (CH1), вариабельный домен легкой цепи антитела (VL), константный домен легкой цепи антитела (CL) и линкер, где указанные домены антител и указанный линкер имеют один из следующих порядков в направлении от N-конца до C-конца: a) VH-CH1-линкер-VL-CL, b) VL-CL-линкер-VH-CH1, c) VH-CL-линкер-VL-CH1 или d) VL-CH1-линкер-VH-CL; и где указанный полипептид представляет собой полипептид, состоящий по меньшей мере из 30 аминокислот, предпочтительно от 32 до 50 аминокислот.

"Выделенное антитело", как используется в настоящем документе, относится к антителу, которое фактически не содержит других антител, имеющих другие антигенные специфичности. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенное антитело фактически не содержит другого клеточного вещества и/или химических соединений.

"Антитело созревшей аффинности" представляет собой антитело с одним или несколькими изменениями в одном или нескольких его CDR, которые приводят к повышению аффинности антитела по отношению к антигену по сравнению с родительским антителом, которое не обладает этим (этими) изменением (изменениями). Иллюстративные антитела созревшей аффинности будут характеризоваться наномолярными или даже пикомолярными аффинностями по отношению к целевому антигену. Антитела созревшей аффинности получают в результате процедур, известных в данной области. Marks et al. (1992) Bio/Technology 10: 779-783 описывают созревание аффинности в результате шаффлинга VH- и VL-доменов. Случайный мутагенез CDR и/или каркасных остатков описан Barbas et al. (1994) Proc Nat. Acad. Sci. USA 91: 3809-3813; Schier et al. (1995) Gene 169: 147-155; Yelton et al. (1995) J. Immunol. 155: 1994-2004; Jackson et al. (1995) J. Immunol. 154(7): 3310-9; и Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226: 889-896; а селективная мутация в положениях селективного мутагенеза, контактных или гипермутационных положениях с активностью, усиливающей аминокислотный остаток, описана в патенте США № 6914128.

Термин "CDR-привитое антитело" относится к антителам, которые содержат последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепи одного вида, но в которых последовательности одного или нескольких CDR-участков VH и/или VL замещены CDR-последовательностями другого вида, например, антитела, имеющие вариабельные участки тяжелой и легкой цепи мыши, в которых один или несколько из участков CDR мыши (например, CDR3) были замещены CDR-последовательностями человека.

Термин "химерное антитело" относится к антителам, которые содержат последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепи одного вида и последовательности константных участков другого вида, например, антитела, имеющие вариабельные участки тяжелой и легкой цепи мыши, связанные с константными участками человека.

Предполагается, что термин "человеческое антитело", как используется в настоящем документе, включает в себя антитела, имеющие вариабельные и константные участки, происходящие из иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии человека. Человеческие антитела по настоящему

раскрытию могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые иммуноглобулиновыми последовательностями зародышевой линии человека (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфичным мутагенезом in vitro или соматической мутацией in vivo), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако термин "человеческое антитело", используемый в настоящем документе, не включает в себя антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающего, такого как мышь, привиты на каркасные последовательности человека.

Термин "гуманизированное антитело" относится к антителам, которые содержат последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепи отличных от человека видов (например, мыши), но в которых по меньшей мере участок VH- и/или VL-последовательности был изменен в целях быть более "подобным человеческому", например, более аналогичным вариабельным последовательностям зародышевой линии человека. Одним типом гуманизированного антитела является CDR-привитое антитело, в котором CDR-последовательности человека вводят в отличные от человеческих VH- и VL-последовательности с замещением соответствующих отличных от человеческих CDR-последовательностей. Кроме того, "гуманизированное антитело" представляет собой антитело или его вариант, производное, аналог или фрагмент, который иммуноспецифически связывается с представляющим интерес антигеном и которое содержит FR-участок, имеющий фактически аминокислотную последовательность человеческого антитела, и CDR-участок, имеющий фактически аминокислотную последовательность отличного от человеческого антитела. Используемый в настоящем документе термин "фактически" в контексте CDR относится к CDR, имеющим аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности отличного от человеческого CDR. Гуманизированное антитело содержит фактически все из по меньшей мере одного и обычно двух вариабельных доменов (Fab, Fab', $F(ab')_2$, FabC, Fv), в которых все или фактически все из CDR-участков соответствуют таковым отличного от человеческого иммуноглобулина (например, донорского антитела) и все или фактически все из FR-участков представляют собой таковые из консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. В соответствии с вариантом осуществления гуманизированное антитело также содержит участок Fc-участка иммуноглобулина, обычно таковой из иммуноглобулина человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гуманизированное антитело содержит легкую цепь, а также по меньшей мере вариабельный домен тяжелой цепи. Антитело также может включать в себя CH1-, шарнирный, CH2-, CH3- и CH4-участки тяжелой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированную легкую цепь. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированную тяжелую цепь. В соответствии с конкретными вариантами осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированный вариабельный домен легкой цепи и/или гуманизированную тяжелую цепь.

Используемый в настоящем документе термин "каркас" или "каркасная последовательность" относится к оставшимся последовательностям вариабельного участка за исключением CDR. Поскольку точное определение CDR-последовательности может определяться при помощи различных систем, значение каркасной последовательности является предметом соответствующим образом различных интерпретаций. Шесть CDR (CDR-L1, -L2 и -L3 легкой цепи и CDR-H1, -H2 и -H3 тяжелой цепи) также разделяют каркасные участки на легкой и тяжелой цепи на четыре подучастка (FR1, FR2, FR3 и FR4) на каждой цепи, в которых CDR1 располагается между FR1 и FR2, CDR2 - между FR2 и FR3, и CDR3 - между FR3 и FR4. Не описывая определенные подучастки FR1, FR2, FR3 или FR4, каркасный участок, как определяется другими, представляет собой объединенный FR в вариабельном участке одной встречающейся в природе иммуноглобулиновой цепи. Используемый в настоящем документе FR представляет собой один из четырех подучастков и FR представляет собой два или более из четырех подучастков, составляющих каркасный участок.

Используемый в настоящем документе термин "ген антител зародышевой линии" или "генный фрагмент" относится к иммуноглобулиновой последовательности, кодируемой нелимфоидными клетками, которые не претерпели процесс созревания, который приводит к генетической реаранжировке и мутации в целях экспрессии определенного иммуноглобулина (см., например, Shapiro et al. (2002) Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200; Marchalonis et al. (2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484: 13-30). Одно из преимуществ, предусматриваемых различными вариантами осуществления настоящего раскрытия, вытекает из признания того, что гены антител зародышевой линии с большей вероятностью, чем гены зрелых антител, сохраняют необходимые структуры аминокислотных последовательностей, характерные для индивидуумов в данном виде, поэтому с меньшей вероятностью распознаются как происходящие из чужеродного источника при терапевтическом применении у этого вида.

Используемый в настоящем документе термин "нейтрализация" относится к противодействию биологической активности антигена в случае, когда связывающий белок специфически связывается с антигеном. В соответствии с одним вариантом осуществления нейтрализующий связывающий белок связывается с антигеном/мишенью, например, цитокином, киназой, фактором роста, белком клеточной поверхности, растворимым белком, фосфатазой или лигандом рецептора и снижает его биологическую актив-

ность по меньшей мере на 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

Термин "связывающий белок", как используется в настоящем документе, включает в себя любой полипептид, который специфически связывается с антигеном (например, TGFβ1), в том числе без ограничения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, DVD-IgTM, TVD-Ig, RAb-Ig, биспецифическим белком и антителом с двойной специфичностью.

Термин "моноклональное антитело" или "mAb" при использовании в настоящем документе в контексте композиции, содержащей то же самое, может означать препарат антитела, получаемый из популяции фактически однородных антител, т.е., отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, при этом они направлены на один антиген. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают в себя разные антитела, направленные на разные детерминанты (эпитопы), каждое mAb направлено на одну детерминанту на антигене. Модификатор "моноклональное" не следует рассматривать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом.

Термин "рекомбинантное человеческое антитело", используемый в настоящем документе, включает в себя все человеческие антитела, получаемые, экспрессируемые, создаваемые или выделяемые рекомбинантными способами, такие как антитела, экспрессируемые при помощи рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описываемые далее в разделе II C ниже), антитела, выделяемые из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител (Hoogenboom, H.R. (1997) TIB Tech. 15: 62-70; Azzazy, H. and Highsmith, W.E. (2002) Clin. Biochem. 35: 425-445; Gavilondo, J.V. and Larrick, J.W. (2002) BioTechniques 29: 128-145; Hoogenboom, H. and Chames, P. (2000) Immunol. Today 21: 371-378, включенные в настоящий документе посредством ссылки), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным по отношению к генам человеческих иммуноглобулинов (см., Taylor, L. D. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295; Kellermann, S-A. and Green, L.L. (2002) Cur. Opin. in Biotechnol. 13: 593-597; Little, M. et al. (2000) Immunol. Today 21: 364-370), или антитела, получаемые, экспрессируемые, создаваемые или выделяемые любым другим способом, который предусматривает сплайсинг последовательностей генов человеческих иммуноглобулинов с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют вариабельные и константные участки, полученные из иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии человека. Однако в соответствии с определенными вариантами осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергают in vitro мутагенезу (или при использовании животного, трансгенного по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу in vivo) и, таким образом, аминокислотные последовательности VH- и VL-участков рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, при том, что получены из VH- и VL-последовательностей зародышевой линии человека или были отнесены к ним, могут не встречаться в природе в репертуаре зародышевой линии человеческих антител in vivo.

Используемые в настоящем документе термины "иммуноглобулин с двойными вариабельным доменом" или "DVD-IgTM" и т.п. включают в себя связывающие белки, содержащие спаренный полипептид с DVD тяжелой цепи и полипептид с DVD легкой цепи, при этом каждая спаренная тяжелая и легкая цепь предусматривают два антигенсвязывающих участка. Каждый связывающий участок включает в себя в общей сложности 6 CDR, участвующих в связывании антигена, на антигенсвязывающий участок. DVD-IgTM обычно имеет два плеча, связанные друг с другом по меньшей мере отчасти в результате димеризации CH3-доменов, при этом каждое плечо DVD является биспецифическим, при этом образуется иммуноглобулин с четырьмя связывающими участками. DVD-IgTM предусмотрен в публикациях патента США № № 2010/0260668 и 2009/0304693, каждая из которых включены в настоящий документ посредством ссылки, в том числе перечни последовательностей.

Используемые в настоящем документе термины "иммуноглобулин с тройным вариабельным доменом" или "TVD-Ig" и т.п. представляют собой связывающие белки, содержащие спаренный связывающий белок с TVD тяжелой цепи и связывающий белок с TVD легкой цепи, при этом каждая спаренная тяжелая и легкая цепь предусматривают три антигенсвязывающих участка. Каждый связывающий участок включает в себя в общей сложности 6 CDR, участвующих в связывании антигена, на антигенсвязывающий участок. Связывающий белок с TVD может иметь два плеча, связанные друг с другом по меньшей мере отчасти в результате димеризации CH3-доменов, при этом каждое плечо TVD-связывающего белка является триспецифическим, при этом образуется связывающий белок с шестью связывающими участками.

Используемые в настоящем документе термины "иммуноглобулин к рецепторам антитела" или "RAb-Ig" и т.п. представляют собой связывающие белки, содержащие полипептид RAb тяжелой цепи и полипептид RAb легкой цепи, которые вместе образуют в общей сложности три антигенсвязывающих участка. Один антигенсвязывающий участок образуется в результате спаривания вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи антитела, присутствующих в каждом полипептиде RAb тяжелой цепи и полипептиде RAb легкой цепи, с образованием одного связывающего участка в общей сложности из 6 CDR, при этом образуется первый антигенсвязывающий участок. Каждый полипептид RAb тяжелой цепи и поли-

пептид RAb легкой цепи включает в себя рецепторную последовательность, которая независимо связывает лиганд, при этом образуется второй и третий антигенсвязывающие участки. RAb-Ig обычно имеет два плеча, связанные друг с другом по меньшей мере отчасти в результате димеризации CH3-доменов, при этом каждое плечо RAb-Ig является триспецифическим, при этом образуется иммуноглобулин с шестью связывающими участками. RAb-Ig описаны в публикации заявки на патент США № 2002/0127231, полное содержание которой, в том числе перечни последовательностей, включены в настоящий документ посредством ссылки.

Термин "биспецифическое антитело", как используется в настоящем документе, и как отличается от "биспецифического связывающего белка на основе полу-Ig" или "биспецифического (полу-Ig) связывающего белка", относится к полноразмерным антителам, которые образуются в результате технологии квадромы (см. Milstein, C. and Cuello, A.C. (1983) Nature 305(5934): p. 537-540), в результате химической конъюгации двух различных моноклональных антител (см. Staerz, U.D. et al. (1985) Nature 314(6012): 628-631) или в результате принципа "выступ во впадину" или аналогичных подходов, при помощи которых вводят мутации в Fc-участок, которые не ингибируют CH3-CH3-димеризацию (см. Holliger, P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90(14): 6444-6448), при этом образуется много различных иммуноглобулиновых молекул, из которых только одна представляет собой функциональное биспецифическое антитело. Благодаря функции молекулы, биспецифическое антитело связывает один антиген (или эпитоп) на одном из его двух связывающих плечей (одна пара HC/LC) и связывает другой антиген (или эпитоп) на его втором плече (другая пара HC/LC). В соответствии с этим определением, биспецифическое антитело имеет два различных антигенсвязывающих плеча (как по специфичности, так и по CDR-последовательностям), и является моновалентным по отношению к каждому антигену, с которым оно связывается.

Термин "антитело с двойной специфичностью", как используется в настоящем документе, и как отличается от биспецифического связывающего белка на основе полу-Ig или биспецифического связывающего белка, относится к полноразмерным антителам, которые могут связывать два различных антигена (или эпитопа), в каждом из своих связывающих плечей (паре HC/LC) (см. публикацию PCT № WO 02/02773). Соответственно связывающий белок с двойной специфичностью имеет два антигенсвязывающих плеча с идентичной специфичностью и идентичными CDR-последовательностями и является бивалентным по отношению к каждому антигену, с которым он связывается.

Термин "антитело к pan-TGFβ" относится к любому антителу, которое способно связывать более одной изоформы TGFβ, например, по меньшей мере две из TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к pan-TGFβ связывает все три изоформы, например, TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к pan-TGFβ связывает и нейтрализует все три изоформы, например, TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3.

Термин "K_{on}", как используется в настоящем документе, относится к константе скорости ассоциации связывающего белка (например, антитела) с антигеном с образованием, например, комплекса антитело/антиген, как известно в данной области. "K_{on}" также известна под терминами "константа скорости ассоциации" или "k_a", как используется взаимозаменяемо в настоящем документе. Это значение, указывающее на скорость связывания антитела со своим целевым антигеном или на скорость образования комплекса между антителом и антигеном, также показано при помощи уравнения: Антитело ("Ab") Антиген ("Ag")→Ab-Ag.

Термин "K_{off}", как используется в настоящем документе, относится к константе скорости диссоциации связывающего белка (например, антитела), например, из комплекса антитело/антиген, как известно в данной области. "K_{off}" также известна под терминами "константа скорости диссоциации" или "k_d", как используется взаимозаменяемо в настоящем документе. Это значение указывает на скорость диссоциации антитела от своего целевого антигена или разделения комплекса Ab-Ag со временем на свободное антитело и антиген, как показано при помощи уравнения: Ab+Ag←Ab-Ag.

Термины "равновесная константа диссоциации" или "K_D", как используется взаимозаменяемо в настоящем документе, относится к значению, получаемому при титриметрическом измерении при равновесии или в результате деления константы скорости диссоциации (k_{off}) на константу скорости ассоциации (k_{on}). Константа скорости ассоциации, константа скорости диссоциации и равновесная константа диссоциации используются для представления аффинности связывания связывающего белка, например, антитела, с антигеном. Способы определения констант скорости ассоциации и диссоциации общеизвестны в данной области. Использование методик на основе флуоресценции обеспечивает высокую чувствительность и способность исследовать образцы в физиологических буферах при равновесии. Можно использовать другие экспериментальные подходы и инструменты, такие как анализ BIAcore® (анализ взаимодействия биологических молекул) (например, инструмент, доступен от BIAcore International AB, компании GE Healthcare, Уппсала, Швеция). Кроме того, также можно использовать анализ KinExA® (Kinetic Exclusion Assay), доступный от Sapidyne Instruments (Бойсе, Айдахо).

Термин "линкер" используется для обозначения полипептидов, содержащих два или более аминокислотных остатка, соединенных пептидными связями и используемыми для связывания одного или не-

скольких антигенсвязывающих белков. Такие линкерные полипептиды общеизвестны в данной области (см., например, Holliger, P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R.J. et al. (1994) Structure 2:1121-1123).

Иллюстративные линкеры включают в себя без ограничения ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 55), ASTKGP (SEQ ID NO: 56); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 57); TVAAP (SEQ ID NO: 58); AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 59); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 60); AKTTPKLGG (SEQ ID NO: 61); SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 62); SAKTTP (SEQ ID NO: 63); RADAAP (SEQ ID NO: 64); RADAAPTVS (SEQ ID NO: 65); RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 66); RADAAAA$(G4S)_4$ (SEQ ID NO: 67); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 68); ADAAP (SEQ ID NO: 69); ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 70); QPKAAP (SEQ ID NO: 71); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 72); AKTTPP (SEQ ID NO: 73); AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 74); AKTTAP (SEQ ID NO: 75); AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 76); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 77); GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 78); GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 79); GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 80); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 81); и ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 82).

Термин "злокачественная опухоль", как используется в настоящем документе, относится к физиологическому состоянию у многоклеточных эукариотов, которое обычно характеризуется нерегулируемой клеточной пролиферацией.

"Метка" или "детектируемая метка" или "детектируемый фрагмент" означает фрагмент, присоединенный к специфическому связывающему партнеру, такому как антитело или аналит, например, для обеспечения реакции между членами специфической связывающей пары, такой как антитело и детектируемый аналит, и специфическим связывающим партнером, например, антителом или аналитом, таким образом, меченый обозначается как "меченый детектируемым образом". Таким образом, термин "меченый связывающий белок", как используется в настоящем документе, относится к белку с включенной меткой, которая обеспечивает выявление связывающего белка. В соответствии с вариантом осуществления метка представляет собой детектируемый маркер, который может приводить к появлению сигнала, который является детектируемым при помощи визуальных или инструментальных средств, например, включения радиоактивно меченой аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинилированных фрагментов, которые можно детектировать при помощи меченого авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер, или активность ферментов, которую можно выявить оптическими или колориметрическими способами). Примеры меток для полипептидов включают в себя без ограничения следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^{3}H ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho и ^{153}Sm); хромогены; флуоресцентные метки (например, FITC, люминоформы на основе комплексов родаминов и лантанидов); ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, люцифераза и щелочная фосфатаза); хемилюминесцентные маркеры; биотинилированные группы; биотинилированные группы; предетерменированные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пар с лейциновыми застежками, связывающие участки вторичных антител, связывающие металл домены и эпитопные метки); и магнитные средства, такие как хелаты гадолиния. Иллюстративные примеры меток, широко применяемых для иммунологических анализов, включают в себя фрагменты, которые приводят к образованию света, например, соединения акридиния, и фрагменты, которые приводят к флуоресценции, например, флуоресцеин. В настоящем документе описаны и другие метки. В этом отношении сам фрагмент может быть не помечен детектируемым образом, однако он становится детектируемым при реакции с другим фрагментом. Применение "помеченого детектируемым образом" предполагает охват последнего типа детектируемого мечения.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс", как используется в настоящем документе, относится к оптическому явлению, которое предусматривает анализ биспецифических взаимодействий в реальном времени посредством детекции изменений концентраций белка в биосенсорной матрице, например, при помощи системы BIAcore® (BIAcore International AB, компания GE Healthcare, Уппсала, Швеция, и Пискатауэй, Нью-Джерси). Более подробное описание см. в Jonsson, U. et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26; Jonsson, U. et al. (1991) Biotechniques 11: 620-627; Johnsson, B. et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8: 125-131; и Johnnson, B. et al. (1991) Anal. Biochem. 198: 268-277.

"Плазмида" или "вектор" включает конструкцию на основе нуклеиновой кислоты, сконструированную для доставки в клетку-хозяина или переноса между различными клетками-хозяевами. "Плазмида

экспрессии" или "вектор экспрессии" может представлять собой плазмиду, которая характеризуется способностью включать и экспрессировать фрагменты гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетку. Плазмида экспрессии может содержать дополнительные элементы, например, вектор экспрессии может иметь две системы репликации, обеспечивая таким образом его поддержание в двух организмах. Нуклеиновая кислота, включенная в плазмиду, может быть функционально связана с последовательностью контроля экспрессии в случае, когда последовательность контроля экспрессии контролирует и регулирует транскрипцию и трансляцию этой полинуклеотидной последовательности.

"Нуклеиновая кислота" или "последовательность нуклеиновой кислоты" может представлять собой любую молекулу, предпочтительно полимерную молекулу, включающую единицы рибонуклеиновой кислоты, дезоксирибонуклеиновой кислоты или их аналог. Нуклеиновая кислота может как одноцепочечной, так и двухцепочечной. Одноцепочечная нуклеиновая кислота может представлять собой одну цепь нуклеиновой кислоты из денатурированной двухцепочечной ДНК. Альтернативно она может представлять собой одноцепочечную нуклеиновую кислоту, не происходящую из какой-либо двухцепочечной ДНК. В соответствии с одним аспектом нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК. В соответствии с другим аспектом нуклеиновая кислота может представлять собой РНК. Подходящей молекулой нуклеиновой кислоты является ДНК, в том числе геномная ДНК или кДНК Другой подходящей молекулой нуклеиновой кислоты является РНК, в том числе мРНК.

За исключением того, что представлено в рабочих примерах, или в случае, когда указано иное, все числа, выражающие компоненты или условия реакций, используемые в настоящем документе, необходимо понимать как модифицированные во всех случаях при помощи термина "приблизительно". Термин "приблизительно" при использовании в связи с процентами, может означать ±1%.

Несмотря на то, что несколько вариантов осуществления настоящего раскрытия были описаны и проиллюстрированы в настоящем документе, специалисты в данной области легко предусмотрят множество средств и/или структур для осуществления функций и/или получения результатов и/или одного или нескольких преимуществ, описываемых в настоящем документе, и каждое из таких вариаций и/или модификаций предусмотрено в объеме настоящего раскрытия. В более общем плане специалисты в данной области легко примут во внимание, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описываемые в настоящем документе, являются иллюстративными, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, для которых используются идеи настоящего раскрытия. Специалисты в данной области распознают или будут способны определить, используя не более чем стандартный эксперимент, многие эквиваленты к конкретным вариантам осуществления настоящего изобретения, описываемым в настоящем документе. Таким образом, следует понимать, что вышеизложенные варианты осуществления представлены лишь в качестве примера и что в объеме прилагаемой формулы изобретения и эквивалентов к ней настоящее раскрытие может применяться на практике иначе, чем так, как конкретным образом описано и представлено в формуле изобретения. Настоящее раскрытие направлено на каждое отдельное свойство, систему, изделие, материал и/или способ, описываемые в настоящем документе. Кроме того, любая комбинация из двух или более таких свойств, систем, изделий, материалов и/или способов в случае, если такие свойства, системы, изделия, материалы и/или способы не являются взаимно противоречащими, включена в объем настоящего раскрытия.

Формы единственного числа, как используется в настоящем документе в описании и в формуле изобретения, если четко не указано противоположное, необходимо понимать как означающие "по меньшей мере одно".

Фраза "и/или", как используется в настоящем документе в описании и в формуле изобретения, следует понимать как означающую "любое из двух или оба вместе" из элементов таким образом соединенных, например, элементов, которые совместно присутствуют в некоторых случаях и раздельно присутствуют в других случаях. Могут необязательно присутствовать другие элементы, отличные от элементов, специфическим образом определяемых условием "и/или", связанных или несвязанных с этими элементами, специфическим образом определяемых, если явно не указано противоположное. Таким образом, в качестве неограничивающего примера отсылка на "А и/или В при использовании в связи с открытой формулировкой, такой как "содержащий", может относиться в соответствии с одним вариантом осуществления к А без В (при этом необязательно включаются элементы, отличные от В); в соответствии с другим вариантом осуществления к В без А (при этом необязательно включаются элементы, отличные от А); в соответствии с еще одним вариантом осуществления как к А, так и к В (при этом необязательно включаются другие элементы); и т.д.

Используемую в настоящем документе в описании и в формуле изобретения фразу "по меньшей мере" по отношению к перечню из одного или нескольких элементов необходимо понимать как означающую по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или нескольких элементов в перечне элементов, но необязательно включающем по меньшей мере одно из каждого и всякого элемента, специфическим образом представленного в перечне элементов, и не исключающем любую комбинацию из элементов в перечне элементов. Это определение также допускает возможность того, что могут необязательно присутствовать элементы, отличные от элементов, специфическим образом определяемых в

перечне элементов, к которым относится фраза "по меньшей мере один", вне зависимости от того связаны или не связаны они с этими элементами, специфическим образом определяемыми. Таким образом, в качестве неограничивающего примера "по меньшей мере одно из A и B" (или, что является эквивалентным "по меньшей мере одно из A или B", или, что является эквивалентным "по меньшей мере одно из A и/или B") может относиться в соответствии с одним вариантом осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, A, при этом B не присутствует (и необязательно включающему элементы, отличные от B); в соответствии с другим вариантом осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, B, при этом A не присутствует (и необязательно включающему элементы, отличные от A); в соответствии с еще одним вариантом осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, A, и по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, B (и необязательно включающему другие элементы); и т.д.

Применение порядковых терминов, таких как "первый", "второй", "третий" и др. в формуле изобретения в целях модификации элемента само по себе не имеет подразумевает какой-либо приоритет, первоочередность или порядок одного элемента формулы изобретения по отношению к другому или временной порядок, в котором события способа выполняются, а используются лишь в качестве меток в целях разграничения одного элемента формулы изобретения, имеющего определенное название, от другого элемента, имеющего то же самое название (но для использования порядкового термина), с разграничением элементов формулы изобретения.

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

Антитела и их антигенсвязывающие участки, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1

Настоящее изобретение основано по меньшей мере отчасти на открытии антител и их антигенсвязывающих участков, которые связывают TGFβ1, который присутствует в комплексе GARP-TGFβ1, комплексе LTBP1-TGFβ1, комплексе LTBP3-TGFβ1 и/или комплексе LRRC33-TGFβ1. Соответственно некоторые аспекты настоящего изобретения связаны с антителами или их антигенсвязывающими участками, которые специфически связываются с эпитопом TGFβ1, где эпитоп является доступным для связывания антителом или его антигенсвязывающими участками, где TGFβ1 присутствует в комплексе GARP-TGFβ1, комплексе LTBP1-TGFβ1, комплексе LTBP3-TGFβ1 и/или комплексе LRRC33-TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эпитоп доступен благодаря конформационному изменению в TGFβ1 при наличии в комплексе с GARP, LTBP1, LTBP3 и/или LRRC33. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эпитоп в TGFβ1, с которым связываются антитела или их антигенсвязывающие участки, недоступен в случае, если TGFβ1 не находится в комплексе с GARP, LTBP1, LTBP3 и/или LRRC33. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки специфически не связываются с TGFβ2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки специфически не связываются с TGFβ3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки не предупреждают связывание TGFβ1 с интегрином. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки не маскируют интегрин-связывающего участка TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки ингибируют активацию TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки ингибирует высвобождение зрелого TGFβ1 из комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и/или комплекса LRRC33-TGFβ1.

Антитела или их антигенсвязывающие участки, предусматриваемые в настоящем документе, специфически связываются с эпитопом TGFβ1, где эпитоп является доступным для связывания антителом или их антигенсвязывающими участками, где TGFβ1 присутствует в комплексе GARP-TGFβ1, комплексе LTBP1-TGFβ1, комплексе LTBP2-TGFβ1 и/или комплексе LRRC33-TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления TGFβ1 содержит встречающуюся в природе аминокислотную последовательность млекопитающего. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления TGFβ1 содержит встречающуюся в природе аминокислотную последовательность человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления TGFβ1 содержит аминокислотную последовательность человека, обезьяны, крысы или мыши. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок, описываемый в настоящем документе, специфически не связывается с TGFβ2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок, описываемый в настоящем документе, специфически не связывается с TGFβ3. В соответствии с некото-

рыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок, описываемый в настоящем документе, специфически не связывается с TGFβ2 или TGFβ3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок, описываемый в настоящем документе, связывается с TGFβ1, содержащим аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 21. Аминокислотная последовательность TGFβ2 и аминокислотная последовательность TGFβ3 изложены в SEQ ID NO: 22 и 23 соответственно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок, описываемый в настоящем документе, специфически связывается с TGFβ1, содержащим не встречающуюся в природе аминокислотную последовательность (иначе обозначаемую в настоящем документе как не встречающийся в природе TGFβ1). Например, не встречающийся в природе TGFβ1 может содержать одну или несколько рекомбинантным образом полученных мутаций по отношению к встречающейся в природе аминокислотной последовательности TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аминокислотная последовательность TGFβ1, TGFβ2 или TGFβ3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 24-35, как показано в табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аминокислотная последовательность TGFβ1, TGFβ2 или TGFβ3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 36-43, как показано в табл. 2.

TGFβ1

LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAG
ESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLL
SRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWL
SRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERA
QHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPC
PYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVR
SCKCS (SEQ ID NO: 21)

TGFβ2

SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEK
ASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNA
SNLVKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSF
DVTDAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELEARFAGIDGTSTYTS
GDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQDNCCL
RPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASP
CCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS (SEQ ID NO: 22)

TGFβ3

SLSLSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLE
EMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVE
KNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWL
SFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHG
RGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCCVR
PLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPC
CVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS (SEQ ID NO: 23)

Таблица 1

Иллюстративные аминокислотные последовательности TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3

Белок	**Последовательность**	**SEQ ID NO**
proTGFβ1	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEV PPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYA KEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELRE AVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIE GFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHG MNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSST EKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGP CPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALE PLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	24
proTGFβ1 C4S	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEV PPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYA KEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELRE AVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIE GFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHG MNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSST EKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGP CPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALE PLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	25
proTGFβ1 D2G	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEV PPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYA KEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELRE AVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIE GFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHG MNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHGALDTNYCFSSTE KNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPC	26

	PYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEP LPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	
proTGFβ1 C4S D2G	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEV PPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYA KEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELRE AVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNS WRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIE GFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHG MNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRALDTNYCFSSTE KNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPC PYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEP LPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	27
proTGFβ2	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYP EPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEE YYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSA MEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIELYQILK SKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDAVHE WLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELE ARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLM LLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQDNCCLR PLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSS DTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIG KTPKIEQLSNMIVKSCKCS	28
proTGFβ2 C5S	SLSTSSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYP EPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEE YYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSA MEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIELYQILK SKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDAVHE WLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELE ARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLM LLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQDNCCLR PLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSS DTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIG KTPKIEQLSNMIVKSCKCS	29
proTGFβ2 C5S D2G	SLSTSSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYP EPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEE YYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSA MEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIELYQILK SKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDAVHE WLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELE ARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLM LLPSYRLESQQTNRRKGALDAAYCFRNVQDNCCLRPL YIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDT QHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKT PKIEQLSNMIVKSCKCS	30
proTGFβ2 D2G	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYP EPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEE YYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSA MEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIELYQILK SKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEGEWLSFDVTDAVHE WLHHKDRNLGFKISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELE ARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLM	31

	LLPSYRLESQQTNRRKGALDAAYCFRNVQDNCCLRPL YIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDT QHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKT PKIEQLSNMIVKSCKCS	
proTGFβ3	SLSLSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPT VMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENT ESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRF NVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQ ILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVRE WLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIK FKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPP HRLDNPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCCVRPLY IDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTT HSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRT PKVEQLSNMVVKSCKCS	32
proTGFβ3 C7S	SLSLSTSTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPT VMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENT ESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRF NVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQ ILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVRE WLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIK FKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPP HRLDNPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCCVRPLY IDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTT HSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRT PKVEQLSNMVVKSCKCS	33
proTGFβ3 C7S D2G	SLSLSTSTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPT VMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENT ESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRF NVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQ ILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVRE WLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIK FKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPP HRLDNPGQGGQRKGALDTNYCFRNLEENCCVRPLYI DFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTH STVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTP KVEQLSNMVVKSCKCS	34
proTGFβ3 D2G	SLSLSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPT VMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENT ESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRF NVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQ ILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVRE WLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIK FKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPP HRLDNPGQGGQRKGALDTNYCFRNLEENCCVRPLYI DFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTH STVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTP KVEQLSNMVVKSCKCS	35

Таблица 2

Иллюстративные отличные от человеческих аминокислотные последовательности

Белок	Вид	Последовательность	SEQ ID NO
proTGFβ1	Мышь	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNT SDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQK YSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQW LNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKR RGDLGTIHDMNRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHRR ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHE PKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIV RSCKCS	36
proTGFβ1	Макак-крабоед	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNT SELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQW LSRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNTLQVDINGFTTGR RGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRR ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHE PKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMI VRSCKCS	37
TGFβ1 LAP C4S	Мышь	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNT SDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQK YSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQW LNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKR RGDLGTIHDMNRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHRR	38
TGFβ1 LAP C4S	Макак-крабоед	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNT SELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQW LSRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNTLQVDINGFTTGR RGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRR	39
proTGFβ1 C4S D2G	Мышь	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNT SDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQK YSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQW LNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKR RGDLGTIHDMNRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHGA LDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPG ASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVR SCKCS	40
proTGFβ1 C4S	Мышь	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEAD	41

		YYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNT SDIREAVPEPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQK YSNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGVVRQW LNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKLHVEINGISPKR RGDLGTIHDMNRPFLLLMATPLERAQHLHSSRHRR ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHE PKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIV RSCKCS	
proTGFβ1 C4S	Макак- крабоед	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNT SELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQW LSRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNTLQVDINGFTTGR RGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRR ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHE PKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMI VRSCKCS	42
proTGFβ1 C4S D2G	Макак- крабоед	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQG EVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEAD YYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNT SELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQK YSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQW LSRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNTLQVDINGFTTGR RGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHGA LDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPG ASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVR SCKCS	43
LTBP3	Макак- крабоед	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKG QCRDSCQQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSGFRVVVC PLPCMNGGQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAGGAG GGTGGSGPGLSRAGALSTGALPPLAPEGDSVASKH AIYAVQVIADPPGPGEGPPAQHAAFLVPLGPGQISA EVQAPPPVVNVRVHHPPEASVQVHRIESSNAEGAA PSQHLLPHPKPSHPRPPTQKPLGRCFQDTLPKQPCG SNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHKCPQLQYT GVQKPGPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINEC AMPGVCRHGDCLNNPGSYRCVCPPGHSLGPSRTQC IADKPEEKSLCFRLVSPEHQCQHPLTTRLTRQLCCC SVGKAWGARCQRCPADGTAAFKEICPAGKGYHILT SHQTLTIQGESDFSLFLHPDGPPKPQQLPESPSQAPP PEDTEEERGVTTDSPVSEERSVQQSHPTATTSPARP YPELISRPSPPTMRWFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTET DECRLNQNICGHGECVPGPPDYSCHCNPGYRSHPQ HRYCVDVNECEAEPCGPGRGICMNTGGSYNCHCN RGYRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGFCINF PGHYKCNCYPGYRLKASRPPVCEDIDECRDPSSCPD GKCENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGACRDVNECAE GSPCSPGWCENLPGSFRCTCAQGYAPAPDGRSCVD	44

		VDECEAGDVCDNGICTNTPGSFQCQCLSGYHLSRD RSHCEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPQGH RLVGGRKCQDIDECTQDPGLCLPHGACKNLQGSYV CVCDEGFTPTQDQHGCEEVEQPHHKKECYLNFDDT VFCDSVLATNVTQQECCCSLGAGWGDHCEIYPCPV YSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDEC MLFGAEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNL LECVDVDECLDESNCRNGVCENTRGGYRCACTPPA EYSPAQRQCLSPEEMDVDECQDPAACRPGRCVNLP GSYRCECRPPWVPGPSGRDCQLPESPAERAPERRD VCWSQRGEDGMCAGPQAGPALTFDDCCCRQGRG WGAQCRPCPPRGAGSQCPTSQSESNSFWDTSPLLL GKPRRDEDSSEEDSDECRCVSGRCVPRPGGAVCEC PGGFQLDASRARCVDIDECRELNQRGLLCKSERCV NTSGSFRCVCKAGFARSRPHGACVPQRRR	
LTBP3	Мышь	GPAGERGTGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKG QCRDSCQQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSAFRVVVC PLPCMNGGQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAAGTG AGTGSSGPGLARTGAMSTGPLPPLAPEGESVASKH AIYAVQVIADPPGPGEGPPAQHAAFLVPLGPGQISA EVQAPPPVVNVRVHHPPEASVQVHRIEGPNAEGPA SSQHLLPHPKPPHPRPPTQKPLGRCFQDTLPKQPCG SNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHKCPQLQYT GVQKPVPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINEC AMPGNVCHGDCLNNPGSYRCVCPPGHSLGPLAAQ CIADKPEEKSLCFRLVSTEHQCQHPLTTRLTRQLCC CSVGKAWGARCQRCPADGTAAFKEICPGKGYHILT SHQTLTIQGESDFSLFLHPDGPPKPQQLPESPSRAPP LEDTEEERGVTMDPPVSEERSVQQSHPTTTTSPPRP YPELISRPSPPTFHRFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTETD ECRLNQNICGHGQCVPGPSDYSCHCNAGYRSHPQH RYCVDVNECEAEPCGPGKGICMNTGGSYNCHCNR GYRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGFCINFP GHYKCNCYPGYRLKASRPPICEDIDECRDPSTCPDG KCENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGACRDVNECSEG TPCSPGWCENLPGSYRCTCAQYEPAQDGLSCIDVD ECEAGKVCQDGICTNTPGSFQCQCLSGYHLSRDRS RCEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPLGHRL VGGRKCKKDIDECSQDPGLCLPHACENLQGSYVCV CDEGFTLTQDQHGCEEVEQPHHKKECYLNFDDTVF CDSVLATNVTQQECCCSLGAGWGDHCEIYPCPVYS SAEFHSLVPDGKRLHSGQQHCELCIPAHRDIDECILF GAEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLLEC VDVDECLDESNCRNGVCENTRGGYRCACTPPAEYS PAQAQCLIPERWSTPQRDVKCAGASEERTACVWGP WAGPALTFDDCCCRQPRLGTQCRPCPPRGTGSQCP TSQSESNSFWDTSPLLLGKSPRDEDSSEEDSDECRC VSGRCVPRPGGAVCECPGGFQLDASRARCVDIDEC RELNQRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCKAGFTRSRP HGPACLSAAADDAAIAHTSVIDHRGYFH	45
LTBP1S	Макак-крабоед	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTLI SENGHAADTLTATNFRVVLCHLPCMNGGQCSSRD	46

		KCQCPPNFTGKLCQIPVHGASVPKLYQHSQQPGKA LGTHVIHSTHTLPLTVTSQQGVKVKFPPNIVNIHVK HPPEASVQIHQVSRIDGPTGQKTKEAQPGQSQVSYQ GLPVQKTQTIHSTYSHQQVIPHVYPVAAKTQLGRCF QETIGSQCGKALPGLSKQEDCCGTVGTSWGFNKCQ KCPKKPSYHGYNQMMECLPGYKRVNNTFCQDINE CQLQGVCPNGECLNTMGSYRCTCKIGFGPDPTFSSC VPDPPVISEEKGPCYRLVSSGRQCMHPLSVHLTKQL CCCSVGKAWGPHCEKCPLPGTAAFKEICPGGMGYT VSGVHRRRPIHHHVGKGPVFVKPKNTQPVAKSTHP PPLPAKEEPVEALTFSREHGPGVAEPEVATAPPEKEI PSLDQEKTKLEPGQPQLSPGISTIHLHPQFPVVIEKTS PPVPVEVAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDI CGAGHCINLPVRYTCICYEGYKFSEQQRKCVDIDEC TQVQHLCSQGRCENTEGSFLCICPAGFMASEEGTNC IDVDECLRPDVCGEGHCVNTVGAFRCEYCDSGYR MTQRGRCEDIDECLNPSTCPDEQCVNSPGSYQCVP CTEGFRGWNGQCLDVDECLEPNVCTNGDCSNLEG SYMCSCHKGYTRTPDHKHCKDIDECQQGNLCVNG QCKNTEGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECQHH HLCAHGQCRNTEGSFQCVCDQGYRASGLGDHCEDI NECLEDKSVCQRGDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDN KTCQDINECEHPGLCGPQGECLNTEGSFHCVCQQG FSISADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCDNTAGSFR CLCYQGFQAPQDGQGCVDVNECELLSGVCGEAFC ENVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRSRTSTDLDV EQPKEEKKECYYNLNDASLCDNVLAPNVTKQECC CTSGAGWGDNCEIFPCPVLGTAEFTEMCPKGKGFV PAGESSSEAGGENYKDADECLLFGQEICKNGFCLNT RPGYECYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPSSCID GQCVNTEGSYNCFCTHPMVLDASEKRCIRPAESNE QIEETDVYQDLCWEHLSDEYVCSRPLVGKQTTYTE CCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYAQLCNIPVTG RRQPYGRDALVDFSEQYAPEADPYFIQDRFLNSFEE LQAEECGILNGCENGRCVRVQEGYTCDCFDGYHLD TAKMTCVDVNECDELNNRMSLCKNAKCINTEGSY KCLCLPGYVPSDKPNYCTPLNTALNLEKDSDLE	
LTBP1S	Мышь	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGNCQNSCQKGNTTTL ISENGHAADTLTATNFRVVICHLPCMNGGQCSSRD KCQCPPNFTGKLCQIPVLGASMPKLYQHAQQQGKA LGSHVIHSTHTLPLTMTSQQGVKVKFPPNIVNIHVK HPPEASVQIHQVSRIDSPGGQKVKEAQPGQSQVSYQ GLPVQKTQTVHSTYSHQQLIPHVYPVAAKTQLGRC FQETIGSQCGKALPGLSKQEDCCGTVGTSWGFNKC QKCPKKQSYHGYTQMMECLQGYKRVNNTFCQDIN ECQLQGVCPNGECLNTMGSYRCSCKMGFGPDPTFS SCVPDPPVISEEKGPCYRLVSPGRHCMHPLSVHLTK QICCCSVGKAWGPHCEKCPLPGTAAFKEICPGGMG YTVSGVHRRRPIHQHIGKEAVYVKPKNTQPVAKST HPPPLPAKEEPVEALTSSWEHGPRGAEPEVVTAPPE KEIPSLDQEKTRLEPGQPQLSPGVSTIHLHPQFPVVV EKTSPPVPVEVAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECTV	47

		NPDICGAGHCINLPVRYTCICYEGYKFSEQLRKCVD IDECAQVRHLCSQGRCENTEGSFLCVCPAGFMASE EGTNCIDVDECLRPDMCRDGRCINTAGAFRCEYCD SGYRMSRRGYCEDIDECLKPSTCPEEQCVNTPGSYQ CVPCTEGFRGWNGQCLDVDECLQPKVCTNGSCTN LEGSYMCSCHRGYSPTPDHRHCQDIDECQQGNLCM NGQCRNTDGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECE HHHLCSHGQCRNTEGSFQCVCNQGYRASVLGDHC EDINECLEDSSVCQGGDCINTAGSYDCTCPDGFQLN DNKGCQDINECAQPGLCGSHGECLNTQGSFHCVCE QGFSISADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCDNTAGS FRCLCYQGFQAPQDGQGCVDVNECELLSGVCGEAF CENVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRSRVTEDSG VDRQPREEKKECYYNLNDASLCDNVLAPNVTKQE CCCTSGAGWGDNCEIFPCPVQGTAEFTEMCPRGKG LVPAGESSYDTGGENYKDADECLLFGEEICKNGYC LNTQPGYECYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPN SCIDGQCVNTEGSYNCFCTHPMVLDASEKRCVQPT ESNEQIEETDVYQDLCWEHLSEEYVCSRPLVGKQT TYTECCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYAQLCNI PVTGRRRPYGRDALVDFSEQYGPETDPYFIQDRFLN SFEELQAEECGILNGCENGRCVRVQEGYTCDCFDG YHLDMAKMTCVDVNECSELNNRMSLCKNAKCINT EGSYKCLCLPGYIPSDKPNYCTPLNSALNLDKESDL E	
GARP	Мышь	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQ ALYLSGNQLQSILVSPLGFYTALRHLDLSDNQISFLQ AGVFQALPYLEHLNLAHNRLATGMALNSGGLGRL PLLVSLDLSGNSLHGNLVERLLGETPRLRTLSLAEN SLTRLARHTFWGMPAVEQLDLHSNVLMDIEDGAFE ALPHLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLQVLDLSCNSIE AFQTAPEPQAQFQLAWLDLRENKLLHFPDLAVFPR LIYLNVSNNLIQLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSASPLS NPSRNASTHPLSQLLNLDLSYNEIELVPASFLEHLTS LRFLNLSRNCLRSFEARQVDSLPCLVLLDLSHNVLE ALELGTKVLGSLQTLLLQDNALQELPPYTFASLASL QRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFSGIPTLHVL NMAGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVA TGALVGLEASLEVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLK RLNLAENQLSHLPAWTRAVSLEVLDLRNNSFSLLP GNAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLH QGRVDVDATQDLICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKG GLKNVNLILLLSFTLVSAIVLTTLATICFLRRQKLSQ QYKA	48
sGARP	Мышь	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQ ALYLSGNQLQSILVSPLGFYTALRHLDLSDNQISFLQ AGVFQALPYLEHLNLAHNRLATGMALNSGGLGRL PLLVSLDLSGNSLHGNLVERLLGETPRLRTLSLAEN SLTRLARHTFWGMPAVEQLDLHSNVLMDIEDGAFE ALPHLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLQVLDLSCNSIE AFQTAPEPQAQFQLAWLDLRENKLLHFPDLAVFPR LIYLNVSNNLIQLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSASPLS	49
		NPSRNASTHPLSQLLNLDLSYNEIELVPASFLEHLTS LRFLNLSRNCLRSFEARQVDSLPCLVLLDLSHNVLE ALELGTKVLGSLQTLLLQDNALQELPPYTFASLASL QRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFSGIPTLHVL NMAGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVA TGALVGLEASLEVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLK RLNLAENQLSHLPAWTRAVSLEVLDLRNNSFSLLP GNAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLH QGRVDVDATQDLICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKG GLKNVN	

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок, как описано в настоящем документе, способен связываться с комплексом LTBP1-TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антигенные белковые комплексы (например, комплекс LTBP-TGFβ1) могут представлять собой один или несколько белков LTBP (например, LTBP1, LTBP2, LTBP3 и LTBP4). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP1 представляет собой встречающийся в природе белок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP1 представляет собой не встречающийся в природе белок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP1 представляет собой рекомбинантный белок. Такой рекомби-

нантный белок LTBP1 может представлять собой LTBP1, его альтернативные сплайс-варианты и/или фрагменты. Рекомбинантные белки LTBP1 можно также модифицировать в целях содержания одной или нескольких детектируемых меток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP1 содержит лидерную последовательность (например, нативную или ненативную лидерную последовательность). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP1 не содержит лидерную последовательность (например, лидерная последовательность была подвержена процессингу или расщеплена). Такие детектируемые метки могут включать в себя без ограничения биотиновые метки, полигистидиновые метки, myc-метки, HA-метки и/или флуоресцентные метки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP1 представляет собой белок LTBP1 млекопитающего. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP1 представляет собой белок LTBP1 человека, обезьяны, мыши или крысы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 46 и 47 в табл. 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 50 в табл. 3.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок, как описано в настоящем документе, способен связываться с комплексом LTBP3-TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP3 представляет собой встречающийся в природе белок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP3 представляет собой не встречающийся в природе белок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP3 представляет собой рекомбинантный белок. Такой рекомбинантный белок LTBP3 может представлять собой LTBP3, его альтернативные сплайс-варианты и/или фрагменты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP3 содержит лидерную последовательность (например, нативную или ненативную лидерную последовательность). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP3 не содержит лидерную последовательность (например, лидерная последовательность была подвержена процессингу или расщеплена). Рекомбинантные белки LTBP3 можно также модифицировать в целях содержания одной или нескольких детектируемых меток. Такие детектируемые метки могут включать в себя без ограничения биотиновые метки, полигистидиновые метки, myc-метки, HA-метки и/или флуоресцентные метки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP3 представляет собой белок LTBP3 млекопитающего. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP3 представляет собой белок LTBP3 человека, обезьяны, мыши или крысы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP3 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 44 и 45 в табл. 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LTBP1 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 51 в табл. 3.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок, как описано в настоящем документе, способен связываться с комплексом GARP-TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок GARP представляет собой встречающийся в природе белок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок GARP представляет собой не встречающийся в природе белок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок GARP представляет собой рекомбинантный белок. Такой GARP может быть рекомбинантным, обозначающийся в настоящем документе как рекомбинантный GARP. Некоторые рекомбинантные GARP могут содержать одну или несколько модификаций, усечений и/или мутаций по сравнению с GARP дикого типа. Рекомбинантные GARP можно модифицировать в целях растворения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок GARP содержит лидерную последовательность (например, нативную или ненативную лидерную последовательность). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок GARP не содержит лидерную последовательность (например, лидерная последовательность была подвержена процессингу или расщеплена). В соответствии с другими вариантами осуществления рекомбинантные GARP модифицируют в целях содержания одной или нескольких детектируемых меток. В соответствии с дополнительными вариантами осуществления детектируемые метки могут включать в себя без ограничения биотиновые метки, полигистидиновые метки, flag-маркеры, myc-метки, HA-метки и/или флуоресцентные метки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок GARP представляет собой белок GARP млекопитающего. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок GARP представляет собой белок GARP человека, обезьяны, мыши или крысы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок GARP содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 48-49 в табл. 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок GARP содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 52 и 53 в табл. 4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки, описываемые в настоящем документе, не связываются с TGFβ1 контекстно-зависимым образом, например, связывание с TGFβ1 происходило бы только в случае, если бы молекула TGFβ1 образовала комплекс с конкретной представляющей молекулой, такой как GARP. Вместо этого антитела и их антигенсвязывающие участки связываются с TGFβ1 контекстно-зависимым образом. Другими словами, анти-

тела или их антигенсвязывающие участки связываются с TGFβ1 в случае связывания с любой представляющей молекулой: GARP, LTBP1, LTBP3 и/или LRCC33.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок, как описано в настоящем документе, способен связываться с комплексом LRRC33-TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LRRC33 представляет собой встречающийся в природе белок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LRRC33 представляет собой не встречающийся в природе белок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LRRC33 представляет собой рекомбинантный белок. Такой LRRC33 может быть рекомбинантным, обозначающийся в настоящем документе как рекомбинантный LRRC33. Некоторые рекомбинантные белки LRRC33 могут содержать одну или несколько модификаций, усечений и/или мутаций по сравнению с LRRC33 дикого типа. Рекомбинантные белки LRRC33 можно модифицировать в целях растворения. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления эктодомен LRRC33 может экспрессироваться с С-концевой His-меткой с экспрессией растворимого белка LRRC33 (sLRRC33; см., например, SEQ ID NO: 84). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LRRC33 содержит лидерную последовательность (например, нативную или ненативную лидерную последовательность). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LRRC33 не содержит лидерную последовательность (например, лидерная последовательность была подвержена процессингу или расщеплена). В соответствии с другими вариантами осуществления рекомбинантные белки LRRC33 модифицируют в целях содержания одной или нескольких детектируемых меток. В соответствии с дополнительными вариантами осуществления детектируемые метки могут включать в себя без ограничения биотиновые метки, полигистидиновые метки, flag-маркеры, myc-метки, HA-метки и/или флуоресцентные метки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LRRC33 представляет собой белок LRRC33 млекопитающего. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LRRC33 представляет собой белок LRRC33 человека, обезьяны, мыши или крысы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок LRRC33 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 83, 84 и 85 в табл. 4.

Таблица 3

Иллюстративные аминокислотные последовательности LTBP

Белок	**Последовательность**	**SEQ ID NO**
LTBP1S	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTLI SENGHAADTLTATNFRVVICHLPCMNGGQCSSRDK CQCPPNFTGKLCQIPVHGASVPKLYQHSQQPGKALG THVIHSTHTLPLTVTSQQGVKVKFPPNIVNIHVKHPP EASVQIHQVSRIDGPTGQKTKEAQPGQSQVSYQGLP VQKTQTIHSTYSHQQVIPHVYPVAAKTQLGRCFQETI GSQCGKALPGLSKQEDCCGTVGTSWGFNKCQKCPK KPSYHGYNQMMECLPGYKRVNNTFCQDINECQLQG VCPNGECLNTMGSYRCTCKIGFGPDPTFSSCVPDPPV ISEEKGPCYRLVSSGRQCMHPLSVHLTKQLCCCSVG KAWGPHCEKCPLPGTAAFKEICPGGMGYTVSGVHR RRPIHHHVGKGPVFVKPKNTQPVAKSTHPPPLPAKE EPVEALTFSREHGPGVAEPEVATAPPEKEIPSLDQEK TKLEPGQPQLSPGISTIHLHPQFPVVIEKTSPPVPVEV APEASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGHCIN LPVRYTCICYEGYRFSEQQRKCVDIDECTQVQHLCS	50

	QGRCENTEGSFLCICPAGFMASEEGTNCIDVDECLRP DVCGEGHCVNTVGAFRCEYCDSGYRMTQRGRCEDI DECLNPSTCPDEQCVNSPGSYQCVPCTEGFRGWNG QCLDVDECLEPNVCANGDCSNLEGSYMCSCHKGYT RTPDHKHCRDIDECQQGNLCVNGQCKNTEGSFRCT CGQGYQLSAAKDQCEDIDECQHRHLCAHGQCRNTE GSFQCVCDQGYRASGLGDHCEDINECLEDKSVCQR GDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDNKTCQDINECEHPG LCGPQGECLNTEGSFHCVCQQGFSISADGRTCEDIDE CVNNTVCDSHGFCDNTAGSFRCLCYQGFQAPQDGQ GCVDVNECELLSGVCGEAFCENVEGSFLCVCADEN QEYSPMTGQCRSRTSTDLDVDVDQPKEEKKECYYN LNDASLCDNVLAPNVTKQECCCTSGVGWGDNCEIF PCPVLGTAEFTEMCPKGKGFVPAGESSSEAGGENYK DADECLLFGQEICKNGFCLNTRPGYECYCKQGTYY DPVKLQCFDMDECQDPSSCIDGQCVNTEGSYNCFCT HPMVLDASEKRCIRPAESNEQIEETDVYQDLCWEHL SDEYVCSRPLVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALC PLKDSDDYAQLCNIPVTGRRQPYGRDALVDFSEQYT PEADPYFIQDRFLNSFEELQAEECGILNGCENGRCVR VQEGYTCDCFDGYHLDTAKMTCVDVNECDELNNR MSLCKNAKCINTDGSYKCLCLPGYVPSDKPNYCTPL NTALNLEKDSDLE	
LTBP3	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKG QCRDSCQQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSGFRVVVCP LPCMNGGQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAGGAGG GTGGSGPGLSRTGALSTGALPPLAPEGDSVASKHAI YAVQVIADPPGPGEGPPAQHAAFLVPLGPGQISAEV QAPPPVVNVRVHHPPEASVQVHRIESSNAESAAPSQ HLLPHPKPSHPRPPTQKPLGRCFQDTLPKQPCGSNPL PGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHKCPQLQYTGVQK PGPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECAMPGV CRHGDCLNNPGSYRCVCPPGHSLGPSRTQCIADKPE EKSLCFRLVSPEHQCQHPLTTRLTRQLCCCSVGKAW GARCQRCPTDGTAAFKEICPAGKGYHILTSHQTLTIQ GESDFSLFLHPDGPPKPQQLPESPSQAPPPEDTEEERG VTTDSPVSEERSVQQSHPTATTTPARPYPELISRPSPP TMRWFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTETDECRLNQNICG HGECVPGPPDYSCHCNPGYRSHPQHRYCVDVNECE AEPCGPGRGICMNTGGSYNCHCNRGYRLHVGAGGR SCVDLNECAKPHLCGDGGFCINFPGHYKCNCYPGY RLKASRPPVCEDIDECRDPSSCPDGKCENKPGSFKCI ACQPGYRSQGGGACRDVNECAEGSPCSPGWCENLP GSFRCTCAQGYAPAPDGRSCLDVDECEAGDVCDNG ICSNTPGSFQCQCLSGYHLSRDRSHCEDIDECDFPAA CIGGDCINTNGSYRCLCPQGHRLVGGRKCQDIDECS QDPSLCLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQHG CEEVEQPHHKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQE CCCSLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGY TQDNNIVNYGIPAHRDIDECMLFGSEICKEGKCVNT QPGYECYCKQGFYYDGNLLECVDVDECLDESNCRN GVCENTRGGYRCACTPPAEYSPAQRQCLSPEEMDV	51
	DECQDPAACRPGRCVNLPGSYRCECRPPWVPGPSGR DCQLPESPAERAPERRDVCWSQRGEDGMCAGPLAG PALTFDDCCCRQGRGWGAQCRPCPPRGAGSHCPTS QSESNSFWDTSPLLLGKPPRDEDSSEEDSDECRCVSG RCVPRPGGAVCECPGGFQLDASRARCVDIDECRELN QRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCKAGFARSRPHGACV PQRRR	

Таблица 4

Иллюстративные аминокислотные последовательности GARP и LRRC33

Белок	**Последовательность**	**SEQ ID NO**
GARP	AQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTET LDLSGNQLRSILASPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGA FQALTHLEHLSLAHNRLAMATALSAGGLGPLPRVTSL DLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRH TFRDMPALEQLDLHSNVLMDIEDGAFEGLPRLTHLNL SRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEF QLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPT GPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSQLLN LDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARR LGSLPCLMLLDLSHNALETLELGARALGSLRTLLLQG NALRDLPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPG PSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFLHTPLTEL DLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVLQ VDLPCFICLKRLNLAENRLSHLPAWTQAVSLEVLDLR NNSFSLLPGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWL AAQLHQGRVDVDATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDC EKGGLKNINLIIIILTFILVSAILLTTLAACCCVRRQKFNQ QYKA	52
sGARP	AQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTET LDLSGNQLRSILASPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGA FQALTHLEHLSLAHNRLAMATALSAGGLGPLPRVTSL DLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRH TFRDMPALEQLDLHSNVLMDIEDGAFEGLPRLTHLNL SRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEF QLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPT GPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSQLLN LDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARR LGSLPCLMLLDLSHNALETLELGARALGSLRTLLLQG NALRDLPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPG PSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFLHTPLTEL DLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVLQ VDLPCFICLKRLNLAENRLSHLPAWTQAVSLEVLDLR NNSFSLLPGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWL AAQLHQGRVDVDATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDC EKGGLKNIN	53
LRRC33 (также известен как	**MELLPLWLCLGFHFLTVG**WRNRSGTATAASQGVC KLVGGAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKT	83

NRROS; № доступа в Uniprot Q86YC3)	LWNHSLQPYPLLESLSLHSCHLERISRGAFQEQGHLRS LVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRLDLSGNALTE DMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERL RELDLQRNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLAFNNLPCIV DFGLTRLRVLNVSYNVLEWFLATGGEAAFELETLDLS HNQLLFFPLLPQYSKLRTLLLRDNNMGFYRDLYNTSS PREMVAQFLLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDLADLRF LDMSQNQFQYLPDGFLRKMPSLSHLNLHQNCLMTLHI REHEPPGALTELDLSHNQLSELHLAPGLASCLGSLRLF NLSSNQLLGVPPGLFANARNITTLDMSHNQISLCPLPA ASDRVGPPSCVDFRNMASLRSLSLEGCGLGALPDCPF QGTSLTYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSL RNMGLHSSFMALDFSGFGNLRDLDLSGNCLTTFPRFG GSLALETLDLRRNSLTALPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQ NPYDCCGVDGWGALQHGQTVADWAMVTCNLSSKII RVTELPGGVPRDCKWERLDLGLLYLVLILPSCLTLLV ACTVIVLTFKKPLLQVIKSRCHWSSVY * Нативный сигнальный пептид обозначен жирным шрифтом.	
Растворимый LRRC33 (sLRRC33)	**MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLG**WRNRSGTATAAS QGVCKLVGGAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDA NPLKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSCHLERISRGAFQEQ GHLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRLDLSG NALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFE GLERLRELDLQRNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLAFNN LPCIVDFGLTRLRVLNVSYNVLEWFLATGGEAAFELE TLDLSHNQLLFFPLLPQYSKLRTLLLRDNNMGFYRDL YNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDL ADLRFLDMSQNQFQYLPDGFLRKMPSLSHLNLHQNC LMTLHIREHEPPGALTELDLSHNQLSELHLAPGLASCL GSLRLFNLSSNQLLGVPPGLFANARNITTLDMSHNQIS LCPLPAASDRVGPPSCVDFRNMASLRSLSLEGCGLGA LPDCPFQGTSLTYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPML QVLSLRNMGLHSSFMALDFSGFGNLRDLDLSGNCLTT FPRFGGSLALETLDLRRNSLTALPQKAVSEQLSRGLRT IYLSQNPYDCCGVDGWGALQHGQTVADWAMVTCNL SSKIIRVTELPGGVPRDCKWERLDLGLHHHHHH * Модифицированный сигнальный пептид легкой каппа-цепи человека обозначен жирным шрифтом. ** Гистидиновая метка подчеркнута.	84
Химера LRRC33-GARP человека	**MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLG**WRNRSGTATAAS QGVCKLVGGAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDA NPLKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSCHLERISRGAFQEQ GHLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRLDLSG NALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFE GLERLRELDLQRNYIFEIEGGAFDGLAELRHLNLAFNN LPCIVDFGLTRLRVLNVSYNVLEWFLATGGEAAFELE TLDLSHNQLLFFPLLPQYSKLRTLLLRDNNMGFYRDL YNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVSLWEEFSSSDL ADLRFLDMSQNQFQYLPDGFLRKMPSLSHLNLHQNC	85
	LMTLHIREHEPPGALTELDLSHNQLSELHLAPGLASCL GSLRLFNLSSNQLLGVPPGLFANARNITTLDMSHNQIS LCPLPAASDRVGPPSCVDFRNMASLRSLSLEGCGLGA LPDCPFQGTSLTYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPML QVLSLRNMGLHSSFMALDFSGFGNLRDLDLSGNCLTT FPRFGGSLALETLDLRRNSLTALPQKAVSEQLSRGLRT IYLSQNPYDCCGVDGWGALQHGQTVADWAMVTCNL SSKIIRVTELPGGVPRDCKWERLDLGL*LIIILTFILVSAIL LTTLAACC*CVRRQKFNQQYKA * Модифицированный сигнальный пептид легкой каппа-цепи человека обозначен жирным шрифтом. ** Эктодомен LRRC33 подчеркнут. # Трансмембранный домен GARP выделен курсивом. ## Внутриклеточный хвост GARP подчеркнут двойной линией.	

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие

участки по настоящему изобретению, которые специфически связываются с эпитопом TGFβ1, который доступен для связывания антителом в случае, если TGFβ1 присутствует в комплексе GARP-TGFβ1, комплексе LTBP1-TGFβ1, комплексе LTBP3-TGFβ1 и/или комплексе LRRC33-TGFβ1, и молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему раскрытию, которые кодируют антитела, включают в себя одну или несколько из аминокислотных последовательностей CDR, показанных в табл. 5.

Таблица 5

Участки, определяющие комплементарность тяжелой цепи (CDRH) и легкой цепи (CDRL), как определено при помощи схемы нумерации по Кабату, показаны для антител Ab1 и Ab2

Антитело	Ab1	Ab2
CDRH1 (SEQ ID NO: 1-2)	SYGMH (SEQ ID NO: 1)	SDWIG (SEQ ID NO: 2)
CDRH2 (SEQ ID NO: 3-4)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 3)	VIYPGDSDTRYSASFQG (SEQ ID NO: 4)
CDRH3 (SEQ ID NO: 5-6)	DIRPYGDYSAAFDI (SEQ ID NO: 5)	AAGIAAAGHVTAFDI (SEQ ID NO: 6)
CDRL1 (SEQ ID NO: 7-8)	TGSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 7)	KSSQSVLYSSNNKNYLA (SEQ ID NO: 8)
CDRL2 (SEQ ID NO: 9-10)	EDNQRPS (SEQ ID NO: 9)	WASTRES (SEQ ID NO: 10)
CDRL3 (SEQ ID NO: 11-12)	QSYDSSNHGGV (SEQ ID NO: 11)	QQYYSTPVT (SEQ ID NO: 12)

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 или комплексом LRRC33-TGFβ1, включают в себя любое антитело или его антигенсвязывающий участок, содержащий CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 или CDRL3 или их комбинации, как предусмотрено для любого из антител, показанных в табл. 5. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, включают в себя CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 любого из антител, показанных в табл. 5. Настоящее изобретение также предусматривает любую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу, содержащую CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 или CDRL3, как предусмотрено для любого из антител, показанного в табл. 5. Домены CDR3 тяжелой и легкой цепи антител могут играть особо важную роль в специфичности/аффинности связывания антитела с антигеном. Соответственно антитела, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1 по настоящему раскрытию, или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие такие антитела или их антигенсвязывающие участки, могут включать в себя по меньшей мере CDR3 тяжелой и/или легкой цепи антител, как показано в табл. 5.

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

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления CDRH1 содержит последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 1 и 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления CDRH2 содержит последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 3 и 4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления CDRH3 содержит последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 5 и 6. CDRL1 содержит последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 7 и 8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления CDRL2 содержит последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 9 и 10. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления CDRL3 содержит последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 11 и 12.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления (например, как в случае антитела Ab1, показанного в табл. 5), антитело или его антигенсвязывающий участок, который специфически связывается с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, содержит CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 1, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 3, CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 5, CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 7, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 9, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 11.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий участок 3, определяющий комплементарность (CDR3), имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и вариабельный

участок легкой цепи, содержащий CDR3, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий участок 2, определяющий комплементарность (CDR2), имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR2, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий участок 1, определяющий комплементарность (CDR1), имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательностью, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 13, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательностью, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 14. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 13, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 14.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок, который специфически связывается с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательность нуклеиновой кислоты, изложенной в SEQ ID NO: 91, и аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, идентичной по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности нуклеиновой кислоты, изложенной в SEQ ID NO: 92. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, изложенной в SEQ ID NO: 91, и аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, изложенной в SEQ ID NO: 92.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления (например, как в случае антитела Ab2, показанного в табл. 5), антитело или его антигенсвязывающий участок, который специфически связывается с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, содержит CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 2, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 3, CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 6, CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 8, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 10, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 12.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR3, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR3, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR2, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR2, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR1, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательностью, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 15, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательностью, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 16. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последователь-

ность, изложенную в SEQ ID NO: 15, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 16.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок, который специфически связывается с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательность нуклеиновой кислоты, изложенной в SEQ ID NO: 93, и аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, идентичной по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности нуклеиновой кислоты, изложенной в SEQ ID NO: 94. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, изложенной в SEQ ID NO: 93, и аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, изложенной в SEQ ID NO: 94.

В некоторых примерах любое из антител по настоящему раскрытию, которое специфически связывается с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, включает в себя любое антитело (в том числе их антигенсвязывающие участки), имеющее одну или несколько последовательностей CDR (например, CDRH или CDRL), фактически аналогичных CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и/или CDRL3. Например, антитела могут включать в себя одну или несколько CDR-последовательностей, как показано в табл. 5 (SEQ ID NO: 1-12), содержащих до 5, 4, 3, 2 или 1 включительно вариаций аминокислотных остатков по сравнению с соответствующим CDR-участком в любой из SEQ ID NO: 1-12. Полные аминокислотные последовательности вариабельного участка тяжелой цепи и вариабельного участка легкой цепи антител, приведенных в табл. 5 (например, Ab1 и Ab2), а также последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи антител, представлены ниже.

Ab1 – Аминокислотная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK
YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIRPYGDYSAAFDIWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO: 13)

Ab1 – Последовательность нуклеиновой кислоты вариабельного участка тяжелой цепи

GAGGTGCAACTCGTGGAGTCAGGCGGTGGACTTGTTCAGCCTGGGCGAAGTCTGAG
ACTCTCATGTGCAGCAAGTGGATTCACTTTCTCCAGTTACGGCATGCACTGGGTGAG
ACAGGCGCCTGGAAAGGGTTTGGAATGGGTCGCTGTGATCTCTTACGACGGGTCAA
ACAAATATTACGCGGATTCAGTGAAAGGGCGGTTCACTATTTCACGGGATAACTCCA
AGAACACCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGAGGGCAGAGGACACCGCTGTGTAC
TATTGTGCCCGGGACATAAGGCCTTACGGCGATTACAGCGCCGCATTTGATATTTGG
GGACAAGGCACCCTTGTGACAGTATCTTCT (SEQ ID NO: 91)

Ab1 – Аминокислотная последовательность вариабельного участка легкой цепи

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPSIVIFEDNQRPSGAPD
RFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNHGGVFGGGTQLTVL (SEQ ID NO:
14)

Ab1 – Последовательность нуклеиновой кислоты вариабельного участка легкой цепи
AATTTTATGCTTACCCAACCACATAGTGTGAGTGAGTCTCCCGGCAAGACTGTAACA
ATTTCATGTACCGGCAGCAGTGGCTCCATCGCTAGCAATTATGTGCAATGGTACCAA
CAGCGCCCCGGGAGCGCACCTTCAATAGTGATATTCGAGGATAACCAACGGCCTAG
TGGGGCTCCCGATAGATTTAGTGGGAGTATAGATAGCTCCTCCAACTCTGCCTCTCT
CACCATTAGCGGGCTGAAAACAGAGGATGAAGCCGACTATTACTGCCAAAGCTATG
ATTCTAGCAACCACGGCGGAGTGTTTGGCGGAGGAACACAGCTGACAGTCCTAGG
(SEQ ID NO: 92)

Ab1 – Аминокислотная последовательность тяжелой цепи
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK
YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIRPYGDYSAAFDIWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE
FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT
VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 15)

Ab1 – Аминокислотная последовательность легкой цепи
NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPSIVIFEDNQRPSGAPD
RFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNHGGVFGGGTQLTVLGQPKAAPSV
TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAA
SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 16)

Ab2 – Аминокислотная последовательность вариабельного участка тяжелой цепи
EVQLVQSGAEMKKPGESLKISCKGSGYNFASDWIGWVRQTPGKGLEWMGVIYPGDSDT
RYSASFQGQVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAMYYCASAAGIAAAGHVTAFDIWGQ
GTMVTVSS (SEQ ID NO: 17)

Ab2 – Последовательность нуклеиновой кислоты вариабельного участка тяжелой цепи

GAGGTGCAACTGGTGCAATCCGGAGCCGAGATGAAAAAGCCAGGGGAGAGCCTGA
AGATCTCTTGTAAGGGCTCTGGCTATAACTTCGCTAGTGATTGGATCGGATGGGTGA
GGCAAACCCCCGGAAAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGTGATCTACCCCGGCGACTCC
GACACACGCTATAGCGCCTCATTCCAGGGCCAGGTCACCATAAGTGCTGATAAATC
AATAAATACAGCCTACTTGCAATGGTCAAGTCTGAAAGCCTCAGATACTGCCATGTA
CTATTGTGCCTCTGCCGCCGGCATTGCCGCGGCCGGTCACGTCACCGCCTTCGACAT
TTGGGGTCAGGGCACTATGGTCACTGTAAGCTCC (SEQ ID NO: 93)

Ab2 – Аминокислотная последовательность вариабельного участка легкой цепи
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPVTFGQGTKLEIK (SEQ ID
NO: 18)

Ab2 – Последовательность нуклеиновой кислоты вариабельного участка легкой цепи
GACATAGTCATGACCCAGTCACCTGACTCTTTGGCCGTGTCTCTGGGGGAGAGAGCC
ACAATAAATTGCAAGTCATCACAGAGCGTCCTGTACTCCTCCAATAATAAAAATTAC
CTGGCCTGGTACCAGCAAAAGCCCGGGCAACCCCCCAAATTGTTGATTTACTGGGCT
AGTACAAGGGAATCTGGAGTGCCAGACCGGTTTTCTGGTTCTGGATCTGGTACTGAC
TTCACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCCGAAGACGTGGCTGTGTACTATTGTCAG
CAGTACTATAGTACACCAGTTACTTTCGGCCAAGGCACTAAACTCGAAATCAAG
(SEQ ID NO: 94)

Ab2 – Аминокислотная последовательность тяжелой цепи
EVQLVQSGAEMKKPGESLKISCKGSGYNFASDWIGWVRQTPGKGLEWMGVIYPGDSDT
RYSASFQGQVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAMYYCASAAGIAAAGHVTAFDIWGQ
GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA
PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR
LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 19)

Ab2 – Аминокислотная последовательность легкой цепи
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPVTFGQGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 20)

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела по настоящему раскрытию, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и комплексом LRRC33-TGFβ1, включают в себя любое антитело, которое включает в себя вариабельный домен тяжелой цепи под SEQ ID NO: 13 или 17, или вариабельный домен легкой цепи под SEQ ID NO: 14 или 18. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела по настоящему раскрытию, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и комплексом LRRC33-TGFβ1, включают в себя любое антитело, которое включает в себя вариабельные пары тяжелой цепи и легкой цепи под SEQ ID NO: 13 и 14; и 17 и 18.

Аспекты настоящего раскрытия предусматривают антитела, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и комплексом LRRC33-TGFβ1, имеющими вариабельную аминокислотную последовательность тяжелой цепи и/или вариабельную аминокислотную последовательность легкой цепи, гомологичную любой из таковых, описываемых в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело, которое специфически связывается с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и комплексом LRRC33-TGFβ1, содержит вариабельную последовательность тяжелой цепи и вариабельную последовательность легкой цепи, которая идентична по меньшей мере на 75% (например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) вариабельной аминокислотной последовательности тяжелой цепи под SEQ ID NO: 13 или 17, или вариабельной последовательности легкой цепи под SEQ ID NO: 14 или 18. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гомологичные вариабельные аминокислотные последовательности тяжелой цепи и/или вариабельные аминокислотные последовательности легкой цепи не варьируют в любой из CDR-последовательностей, предусматриваемых в настоящем документе. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления степень вариации последовательности (например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) может присутствовать в вариабельной аминокислотной последовательности тяжелой цепи и/или вариабельной аминокислотной последовательности легкой цепи, за исключением любой из CDR-последовательностей, предусматриваемых в настоящем документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела по настоящему раскрытию, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, включают в себя любое антитело или его антигенсвязывающий участок, который включает в себя тяжелую цепь под SEQ ID NO: 15 или 19, или легкую цепь под SEQ ID NO: 16 или 20. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела по настоящему раскрытию, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, включают в себя любое антитело, которое включает в себя пары тяжелой цепи и легкой цепи под SEQ ID NO: 15 и 16; или 19 и 20.

Аспекты настоящего раскрытия предусматривают антитела, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, имеющими аминокислотную последовательность тяжелой цепи и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, гомологичную любой из таковых, описываемых в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело, которое специфически связывается с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, содержит последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи, которая идентична по меньшей мере на 75% (например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) последовательности тяжелой цепи под SEQ ID NO: 15 или 19, или аминокислотной последовательности легкой цепи под SEQ ID NO: 16 или 20. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гомологичные аминокислотные последовательности тяжелой цепи и/или аминокислотные последовательности легкой цепи не варьируют в любой из CDR-последовательностей, предусматриваемых в настоящем документе. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления степень вариации последовательности (например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) может присутствовать в аминокислотной последовательности тяжелой цепи и/или аминокислотной последовательности легкой цепи, за исключением любой из CDR-последовательностей, предусматриваемых в настоящем документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела по настоящему раскрытию, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, включают в себя любое антитело или его антигенсвязывающий участок, который включает в себя тяжелую цепь под SEQ ID NO: 15 или 19, или легкую цепь под SEQ ID NO: 16 или 20. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела по настоящему раскрытию, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, включают в себя любое антитело, которое включает в себя пары тяжелой цепи и легкой цепи под SEQ ID NO: 15 и 16; или 19 и 20.

Аспекты настоящего раскрытия предусматривают антитела, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, имеющими аминокислотную последовательность тяжелой цепи и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, гомологичную любой из таковых, описываемых в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело, которое специфически связывается с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, содержит последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи,

которая идентична по меньшей мере на 75% (например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) последовательности тяжелой цепи под SEQ ID NO: 15 или 19, или аминокислотной последовательности легкой цепи под SEQ ID NO: 16 или 20. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гомологичные аминокислотные последовательности тяжелой цепи и/или аминокислотные последовательности легкой цепи не варьируют в любой из CDR-последовательностей, предусматриваемых в настоящем документе. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления степень вариации последовательности (например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) может присутствовать в аминокислотной последовательности тяжелой цепи и/или аминокислотной последовательности легкой цепи, за исключением любой из CDR-последовательностей, предусматриваемых в настоящем документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "процент идентичности" двух аминокислотных последовательностей определяется при помощи алгоритма Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-68, 1990, модифицированного, как в Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215: 403-10, 1990. Поиски белков BLAST можно выполнять при помощи программы XBLAST, балл=50, длина слова=3, с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белка, представляющим интерес. В случае, если гэпы присутствуют между двумя последовательностями, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) по умолчанию.

В любом из антител или антигенсвязывающих фрагментов, описываемых в настоящем документе, можно вводить одну или несколько консервативных мутаций в CDR или каркасные последовательности в положениях, где маловероятно, что остатки участвуют во взаимодействии "антитело-антиген". В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такую(такие) консервативную(консервативные) мутацию (мутации) можно вводить в CDR или каркасные последовательности в положении(положениях), где маловероятно, что остатки участвуют во взаимодействии с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и комплексом LRRC33-TGFβ1, как определяется на основе кристаллической структуры. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления подходящую поверхность контакта (например, остатки, участвующие во взаимодействии "антиген-антитело") можно найти исходя из известной структурной информации или других общих антигенных структурных аналогий.

Используемый в настоящем документе термин "консервативная аминокислотная замена" относится к аминокислотной замене, которая не изменяет относительный заряд или размерные характеристики белка, в котором выполнена аминокислотная замена. Можно получить варианты в соответствии со способами изменения полипептидной последовательности, известной специалисту в данной области, такими как встречаются в ссылках, которые лежат в основе таких способов, например, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, или Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот включают в себя замены, выполненные среди аминокислот со следующими группами: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; и (g) E, D.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела, предусматриваемые в настоящем документе, содержат мутации, которые придают желаемые свойства антителам. Например, в целях избежания потенциальных осложнений вследствие обмена Fab-фрагмента, который, как известно, происходит с нативными mAb IgG4, антитела, предусматриваемые в настоящем документе, могут содержать стабилизирующую мутацию "Adair" (Angal et al., "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody," Mol Immunol 30, 105-108; 1993), где серин 228 (в соответствии с нумерацией EU; остаток 241 в соответствии с нумерацией по Кабату) преобразован в пролин, при этом образуется IgG1-подобная (CPPCP (SEQ ID NO: 54)) шарнирная последовательность. Соответственно любое из антител может включать стабилизирующую мутацию "Adair" или аминокислотную последовательность CPPCP (SEQ ID NO: 54).

Антитела по настоящему раскрытию, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, могут необязательно содержать константные участки антител или их части. Например, V_L-домен может быть прикреплен на своем C-конце к константному домену легкой цепи, например, Cκ или Cλ. Аналогичным образом, V_H-домен или его участок может быть прикреплен ко всей или части тяжелой цепи, например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и любому изотипическому подклассу. Антитела могут включать в себя подходящие константные участки (см., например, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991)). Таким образом, антитела в объеме настоящего раскрытия могут включать в себя V_H- и V_L-домены или их антигенсвязывающие участки в комбинации с любыми подходящими константными участками.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, могут включать в себя или могут не включать в себя каркасный участок антител под SEQ ID NO: 13-20. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, представляют собой антитела мыши и включают последовательности каркасных участков мыши.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1 по настоящему раскрытию, могут связываться с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1 с относительно высокой аффинностью, например, с K_D, составляющей менее 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M или ниже. Например, антитела, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, могут связываться с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1 с аффинностью от 5 пМ до 500 нМ, например, от 50 пМ до 100 нМ, например, от 500 пМ до 50 нМ. Настоящее раскрытие также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с любым из антител, описываемых в настоящем документе, за связывание с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, и которые характеризуются аффинностью, составляющей 50 нМ или менее (например, 20 нМ или ниже, 10 нМ или ниже, 500 нМ или ниже, 50 нМ или ниже или 5 нМ или ниже). Аффинность и кинетику связывания антител, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, можно исследовать при помощи любого подходящего способа, в том числе без ограничения биосенсорной технологии (например, OCTET или BIACORE).

Антитела, которые ингибируют TGFβ.

Настоящее раскрытие в соответствии с одним аспектом предусматривает функциональные антитела. Используемое в настоящем документе "функциональное антитело" предусматривает одну или несколько биологических активностей посредством своей способности связывать антиген. Функциональные антитела могут включать ингибирующие антитела (или ингибиторные антитела) и активирующие антитела. Таким образом, настоящее раскрытие предусматривает антитела к TGFβ, которые могут модулировать (например, ингибировать или активировать) биологический процесс, опосредуемый передачей сигнала с участием TGFβ.

Используемый в настоящем документе термин "ингибирующее антитело" относится к антителу, которое ингибирует высвобождение зрелого фактора роста или снижает активность факторов роста. Ингибирующие антитела включают в себя антитела, целенаправленно воздействующие на любой эпитоп, который снижает высвобождение факторов роста или активность, ассоциированную с такими антителами. Такие эпитопы могут располагаться на продоменах белков TGFβ (например, TGFβ1), факторов роста или других эпитопах, которые приводят к сниженной активности факторов роста при связывании антителом. Ингибирующие антитела по настоящему изобретению включают в себя без ограничения ингибирующие антитела к TGFβ1.

Варианты осуществления настоящего раскрытия включают в себя способы применения ингибирующих антител в растворе, в культуре клеток и/или у субъектов в целях модификации передачи сигнала с участием факторов роста.

Полипептиды.

Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к полипептиду, имеющему последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 19. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи или домен тяжелой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид по меньшей мере на 75% (например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичен любой из аминокислотных последовательностей, изложенных в SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 19.

Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к полипептиду, имеющему последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 20. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид представляет собой вариабельный домен легкой цепи или домен легкой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид по меньшей мере на 75% (например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичен любой из аминокислотных последовательностей, изложенных в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 20.

Антитела, конкурирующие с антителами, которые специфически связываются с комплексом GARP-

TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к антителам, которые конкурируют или перекрестно конкурируют с любым из антител, предусматриваемых в настоящем документе. Термин "конкурировать", как применяется в настоящем документе по отношению к антителу, означает, что первое антитело связывается с эпитопом (например, эпитопом комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и/или комплекса LRRC33-TGFβ1) при помощи способа, достаточно близкого к связыванию второго антитела, таким образом, что результат связывания первого антитела со своим эпитопом заметным образом снижается в присутствии второго антитела по сравнению со связыванием первого антитела в отсутствие второго антитела. Альтернативная ситуация, когда связывание второго антитела со своим эпитопом также заметным образом снижается в присутствии первого антитела, может, хотя и необязательно, иметь место. То есть, первое антитело может ингибировать связывание второго антитела со своим эпитопом, при этом второе антитело не ингибирует связывание первого антитела со своим соответствующим эпитопом. Однако в случае, если каждое антитело заметным образом ингибирует связывание другого антитела со своим эпитопом или лигандом, вне зависимости от того, в той же степени, большей или меньшей степени, считается, что антитела "перекрестно конкурируют друг с другом за связывание своего (своих) соответствующего (соответствующих) эпитопа (эпитопов). Как конкурирующие, так и перекрестно конкурирующие антитела находятся в объеме настоящего раскрытия. Вне зависимости от механизма, при помощи которого такое конкурирование или перекрестное конкурирование происходит (например, стерическое затруднение, конформационное изменение или связывание с распространенным эпитопом или его участком), специалисту в данной области будет понятно, что такие конкурирующие или перекрестно конкурирующие антитела предусмотрены и могут быть полезными для способов и/или композиций, предусматриваемых в настоящем документе.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к антителам, которые конкурируют или перекрестно конкурируют с любым из антител или его антигенсвязывающими участками, как предусмотрено в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок связывает в том же самом эпитопе или около такового, как и любое из антител, предусматриваемых в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающий участок связывает около эпитопа, если оно связывает в пределах 15 или менее аминокислотных остатков эпитопа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любое из антител или их антигенсвязывающих участков, как предусмотрено в настоящем документе, связывает в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных остатков эпитопа, который связывается любым из антител, предусматриваемых в настоящем документе.

В соответствии с другим вариантом осуществления в настоящем документе предусмотрено антитело или его антигенсвязывающий участок, который конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание с любым из антигенов, предусматриваемых в настоящем документе (например, комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1), с константой равновесной диссоциации, Kd, между антителом и белком, составляющей менее 10^{-6} М. В соответствии с другими вариантами осуществления антитело конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание любого из антигенов, предусматриваемых в настоящем документе, с K_D в диапазоне от 10^{-11} М до 10^{-6} М. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящем документе предусмотрено антитело к TGFβ1 или его антигенсвязывающий участок, который конкурирует за связывание с антителом или его антигенсвязывающим участком, описываемым в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящем документе предусмотрено антитело к TGFβ1 или его антигенсвязывающий участок, который связывается с тем же самым эпитопом, что и антитело или его антигенсвязывающий участок, описываемый в настоящем документе.

Любое из антител, предусматриваемых в настоящем документе, можно охарактеризовать при помощи любых подходящих способов. Например, один способ представляет собой идентификацию эпитопа, с которым антиген связывается, или "картирование эпитопов". Существует много подходящих способов для картирования и характеристики расположения эпитопов на белках, в том числе определение кристаллической структуры комплекса "антитело-антиген", конкурентные анализы, анализы экспрессии генных фрагментов и анализы на основе синтетических пептидов, как описано, например, в главе 11 Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. В дополнительном примере картирование эпитопов можно использовать для определения последовательности, с которой антитело связывается. Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп, т.е. содержащийся в одном участке из аминокислот, или конформационный эпитоп, образованный при помощи пространственного взаимодействия аминокислот, которые необязательно могут содержаться в одном участке (первичной структурной линейной последовательности). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эпитоп представляет собой эпитоп TGFβ1, который доступен только для связывания антителом или его антигенсвязывающим участком, описываемым в настоящем документе, в случае, если TGFβ1 находится в комплексе GARP-TGFβ1, комплексе LTBP1-TGFβ1, комплексе LTBP3-TGFβ1 и/или комплексе LRRC33-TGFβ1. Пептиды различных длин (например, длиной по меньшей мере

4-6 аминокислот) можно выделять или синтезировать (например, рекомбинантным путем) и использовать для анализов связывания с антителом. В другом примере эпитоп, с которым антитело связывается, можно определить при систематическом скрининге при использовании перекрывающихся пептидов, происходящих из целевой антигенной последовательности, и определении связывания антителом. В соответствии с анализами экспрессии генных фрагментов открытая рамка считывания, кодирующая целевой антиген, фрагментируют либо случайным образом, либо при помощи специфических генетических конструкций, и определяют реактивность экспрессируемых фрагментов антигена с антителом, подлежащим исследованию. Генные фрагменты можно получить, например, при помощи ПЦР и затем транскрибировать и транслировать в белок in vitro в присутствии радиоактивных аминокислот. Связывание антитела с радиоактивно мечеными антигенными фрагментами затем определяют при помощи иммунопреципитации и гель-электрофореза. Определенные эпитопы можно также идентифицировать при помощи больших библиотек случайных пептидных последовательностей, представленных на поверхности фаговых частиц (фаговые библиотеки). Альтернативно определенную библиотеку перекрывающихся пептидных фрагментов можно исследовать на предмет связывания с исследуемым антителом в простых анализах связывания. В дополнительном примере можно выполнять мутагенез антигенсвязывающего домена, эксперименты по замене доменов и аланин-сканирующий мутагенез в целях идентификации остатков, требуемых, достаточных и/или необходимых для связывания эпитопа. Например, эксперименты по замене доменов можно выполнять при помощи мутанта целевого антигена, в котором различные фрагменты комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и/или комплекса LRRC33-TGFβ1 были замещены (заменены) последовательностями от близкородственного, но антигенно отдаленного белка, такого как другой член семейства белков TGFβ (например, GDF11). В результате определения связывания антитела с мутантом комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и/или комплекса LRRC33-TGFβ1 можно определить важность определенного антигенного фрагмента для связывания антитела.

Альтернативно конкурентные анализы можно выполнять при помощи других антител, которые, как известно, связываются с тем же самым антигеном, в целях определениях того, связывается ли антитело с тем же самым эпитопом, что и другие антитела. Конкурентные анализы хорошо известны специалистам в данной области.

Кроме того, взаимодействие любого из антител, предусматриваемого в настоящем документе, с одним или несколькими остатками в комплексе GARP-TGFβ1, комплексе LTBP1-TGFβ1, комплексе LTBP3-TGFβ1 и/или комплексе LRRC33-TGFβ1 можно определить при помощи стандартной методики. Например, можно определить кристаллическую структуру и расстояния между остатками в комплексе GARP-TGFβ1, комплексе LTBP1-TGFβ1, комплексе LTBP3-TGFβ1 и/или комплексе LRRC33-TGFβ1 и определить один или несколько остатков в антителе соответственно. На основании такого расстояния можно определить взаимодействует ли конкретный остаток в комплексе GARP-TGFβ1, комплексе LTBP1-TGFβ1, комплексе LTBP3-TGFβ1 и/или комплексе LRRC33-TGFβ1 с одним или несколькими остатками в антителе. Кроме того, можно применять соответствующие способы, такие как конкурентные анализы и анализы на основе целевого мутагенеза для определения предпочтительного связывания кандидатного антитела.

Получение антител, которые связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC 33-TGFβ1.

Многочисленные способы можно применять для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему раскрытию. Например, антитела можно получать при помощи способов на основе рекомбинантной ДНК. Моноклональные антитела можно также получать при помощи создания гибридом (см., например, Kohler and Milstein (1975) Nature, 256: 495-499) в соответствии с известными способами. Гибридомы, образованные таким путем, затем подвергают скринингу при помощи стандартных способов, таких как иммуноферментный анализ (ELISA) и поверхностный плазмонный резонанс (например, OCTET или BIACORE), с идентификацией одной или нескольких гибридом, которые образуют антитело, которое специфически связывается с определяемым антигеном. В качестве иммуногена можно использовать любую форму определяемого антигена, например, рекомбинантный антиген, встречающиеся в природе формы и их любые варианты или фрагменты, а также их антигенный пептид (например, любой из эпитопов, описываемых в настоящем документе в качестве линейного эпитопа или в каркасе в качестве конформационного эпитопа). Один иллюстративный способ получения антител предусматривает скрининг библиотек экспрессии белка, которые экспрессируют антитела или их фрагменты (например, scFv), например, библиотек фагового или рибосомального дисплея. Фаговый дисплей описан, например, в Ladner et al., патенте США № 5223409; Smith (1985) Science 228: 1315-1317; Clackson et al. (1991) Nature, 352: 624-628; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222: 581-597; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; и WO 90/02809.

Помимо использования библиотек дисплея, для иммунизации отличного от человека животного, например, грызуна, например, мыши, хомяка или крысы, можно использовать определяемый антиген (например, комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс

LRRC33-TGFβ1). В соответствии с одним вариантом осуществления отличным от человека животным является мышь.

В соответствии с другим вариантом осуществления моноклональное антитело получают из отличного от человека животного и затем модифицируют, например, делают химерным, при помощи подходящих методик на основе рекомбинантной ДНК. Были описаны ряд подходов для получения химерных антител. См., например, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda et al., Nature 314:452, 1985, Cabillyet al., патент США № 4816567; Boss et al., патент США № 4816397; Tanaguchi et al., публикацию заявки на европейский патент EP171496; публикацию заявки на европейский патент 0173494, патент Великобритании GB 2177096B.

Дополнительные методики получения антител см. в Antibodies: A Laboratory Manual, eds. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Настоящее раскрытие необязательно ограничено каким-либо определенным источником, способом получения или другими особыми характеристиками антитела.

Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к клеткам-хозяевам, трансформированным полинуклеотидом или вектором. Клетки-хозяева могут представлять собой прокариотическую или эукариотическую клетку. Полинуклеотид или вектор, который присутствует в клетке-хозяине, может быть интегрирован в геном клетки-хозяина или может поддерживаться внехромосомно. Клетка-хозяин может представлять собой любую прокариотическую или эукариотическую клетку, такую как бактериальную клетку, клетку насекомого, клетку гриба, растительную клетку, животную клетку или клетку человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетки гриба представляют собой таковые, например, рода Saccharomyces, в частности, вида S. cerevisiae. Термин "прокариотический" включает в себя все бактерии, которые можно трансформировать или трансфицировать молекулами ДНК или РНК в целях экспрессии антитела или соответствующих иммуноглобулиновых цепей. Прокариотические хозяева могут включать в себя грамотрицательные, а также грамположительные бактерии, такие как, например, E. coli, S. typhimurium, Serratia marcescens и Bacillus subtilis. Термин "эукариотический" включает в себя клетки дрожжей, высших растений, насекомых и позвоночных, например, клетки млекопитающих, такие как клетки NSO и CHO. В зависимости от хозяина, используемого в процедуре рекомбинантного получения, антитела или иммуноглобулиновые цепи, кодируемые полинуклеотидом, могут быть гликозилированными или негликозилированными. Антитела или соответствующие иммуноглобулиновые цепи могут также включать в себя начальный остаток аминокислоты метионина.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сразу после включения вектора в соответствующего хозяина можно поддерживать в условиях, подходящих для экспрессии на высоком уровне нуклеотидных последовательностей, и при желании может последовать сбор и очистка иммуноглобулиновых легких цепей, тяжелых цепей, димеров из легких/тяжелых цепей или интактных антител, антигенсвязывающих фрагментов или других иммуноглобулиновых форм; см., Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N.Y., (1979). Таким образом, полинуклеотиды или векторы вводят в клетки, которые в свою очередь продуцируют антитело или антигенсвязывающие фрагменты. Более того, трансгенных животных, предпочтительно млекопитающих, содержащих вышеупомянутые клетки-хозяева, можно использовать для промышленного получения антитела или фрагментов антитела.

Трансформированные клетки-хозяева можно выращивать в ферментерах и культивировать при помощи любых подходящих методик с получением оптимального клеточного роста. После экспрессии целые антитела, их димеры, отдельные легкие и тяжелые цепи, другие иммуноглобулиновые формы или антигенсвязывающие фрагменты можно очищать в соответствии со стандартными процедурами данной области, в том числе преципитацией аммония сульфатом, аффинными колонками, колоночной хроматографией, гель-электрофорезом и т.п.; см. Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). Затем антитело или антигенсвязывающие фрагменты можно выделать из среды для роста, клеточных лизатов или фракций клеточных мембран. Например, выделение и очистку экспрессируемых у микроорганизмов антител или антигенсвязывающих фрагментов можно осуществлять при помощи любых стандартных средств, таких как, например, препаративные хроматографические разделения и иммунологические разделения, такие как таковые, включающие использование моноклональных или поликлональных антител, направленных, например, против константного участка антитела.

Аспекты по настоящему раскрытию относятся к гибридоме, которая представляет собой неопределенно долгий источник моноклональных антител. В качестве альтернативы получения иммуноглобулинов непосредственно из культуры гибридом, иммортализованные клетки гибридом можно использовать в качестве источника реаранжированных локусов тяжелой и легкой цепи для последующей экспрессии и/или манипуляции с генами. Реаранжированные гены антител можно обратно траскрибировать из подходящих мРНК с получением кДНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления константный участок тяжелой цепи можно обменивать на таковой другого изотипа или удалять полностью. Вариабельные участки можно связать в целях кодирования одноцепочечных Fv-участков. Несколько Fv-участков можно связать в целях придания связывающей способности к более чем одной мишени или можно применять комбинации из химерных тяжелой и легкой цепей. Можно применять любой подходящий способ клонирования вариабельных участков антител и создания рекомбинантных антител.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления подходящую нуклеиновую кислоту, кото-

рая кодирует вариабельные участки тяжелой и/или легкой цепи, получают и вставляют в векторы экспрессии, которые можно трансфицировать в стандартные рекомбинантные клетки-хозяева. Можно использовать ряд таких клеток-хозяев. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетки-хозяева млекопитающих могут быть предпочтительными для эффективной обработки и продукции. Типичные клеточные линии млекопитающих, пригодные для этой цели, включают в себя клетки CHO, клетки 293 или клетки NSO. Продукция антитела или антигенсвязывающего фрагмента может осуществляться в результате культивирования модифицированного рекомбинантного хозяина в условиях культивирования, подходящих для роста клеток-хозяев и экспрессии кодирующих последовательностей. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут быть извлечены в результате выделения их из культуры. Можно разработать системы экспрессии с включением сигнальных пептидов таким образом, чтобы образующиеся в результате антитела секретировались в среду; однако также возможна и внутриклеточная продукция.

Настоящее раскрытие также предусматривает полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере вариабельный участок иммуноглобулиновой цепи антител, описываемых в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вариабельный участок, кодируемый полинуклеотидом, содержит по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), VH и/или VL вариабельного участка антитела, продуцируемого любой из вышеописанных гибридом.

Полинуклеотиды, кодирующие антитело или антигенсвязывающие фрагменты, могут представлять собой ДНК, кДНК, РНК или полученную синтетическим путем ДНК или РНК или полученную рекомбинантным путем химерную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую любой из этих полинуклеотидов, как в отдельности, так и в комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полинуклеотид представляет собой часть вектора. Такие векторы могут содержать дополнительные гены, такие как маркерные гены, которые способствуют селекции вектора в подходящей клетке-хозяине и при подходящих условиях.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полинуклеотид функционально связан с последовательностями контроля экспрессии, обеспечивающими экспрессию в прокариотических или эукариотических клетках. Экспрессия полинуклеотида предусматривает транскрипцию полинуклеотида в транслируемую мРНК. Регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию в эукариотических клетках, предпочтительно клетках млекопитающих, хорошо известны специалистам в данной области. Они могут включать в себя регуляторные последовательности, которые облегчают инициацию транскрипции и необязательно передачу сигналов с участием поли-А, которые облегчают терминацию транскрипции и стабилизацию транскрипта. Дополнительные регуляторные элементы могут включать транскрипционные, а также трансляционные энхансеры и/или естественные образом ассоциированные или гетерологные промоторные участки. Вероятные регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию в прокариотических клетках-хозяевах, включают в себя, например, промотор PL, Lac, Trp или Tac в E. coli, а примеры регуляторных элементов, обеспечивающих экспрессию в эукариотических клетках-хозяевах, представляют собой промотор AOX1 или GAL1 у дрожжей или промотор CMV, промотор SV40, промотор RSV (вирус саркомы Рауса), энхансер CMV, энхансер SV40 или интрон глобина в клетках млекопитающих и других животных клетках.

Помимо элементов, которые отвечают за инициацию транскрипции, такие регуляторные элементы могут также включать в себя сигналы терминации транскрипции, такие как участок SV40-поли-А или участок tk-поли-А, расположенные по ходу транскрипции полинуклеотида. Кроме того, в зависимости от используемой системы экспрессии, к кодирующей последовательности полинуклеотида могут быть добавлены и были описаны ранее лидерные последовательности, способные направлять полипептид к клеточному компартменту или секретировать его в среду. Лидерная (лидерные) последовательность (последовательности) собирается (собираются) в соответствующей фазе с последовательностями, регулирующими трансляцию, инициацию и терминацию, и предпочтительно лидерная последовательность способна направлять секрецию транслируемого белка или его участка, например, во внеклеточную среду. Необязательно можно использовать гетерологичную полинуклеотидную последовательность, которая кодирует слитый белок, включающий в себя С- или N-концевой сигнальный пептид, придающий необходимые характеристики, например, стабилизацию или упрощенную очистку экспрессируемого рекомбинантного продукта.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полинуклеотиды, кодирующие по меньшей мере вариабельный домен легкой и/или тяжелой цепи, могут кодировать вариабельные домены как обеих иммуноглобулиновых цепей, так и только одной. Аналогичным образом, полинуклеотиды могут находиться под контролем одного и того же промотора или могут контролироваться в отношении экспрессии отдельно. Кроме того, некоторые аспекты относятся к векторам, в частности, плазмидам, космидам, вирусам и бактериофагам, традиционно используемым в генной инженерии, которые содержат полинуклеотид, кодирующий вариабельный домен иммуноглобулиновой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента; необязательно в комбинации с полинуклеотидом, который кодирует вариабельный домен другой иммуноглобулиновой цепи антитела.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательности контроля экспрессии

предусмотрены в виде эукариотических промоторных систем в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева, однако для прокариотических хозяев также можно использовать и контрольные последовательности. Векторы экспрессии, происходящие из вирусов, таких как ретровирусы, вирус осповакцины, анедоассоциированный вирус, вирус герпеса или вирус папилломы крупного рогатого скота, можно использовать для доставки полинуклеотидов или вектора в целевую клеточную популяцию (например, для разработки клетки в целях экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента). Для конструкции рекомбинантных вирусных векторов можно применять подходящие способы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полинуклеотиды и векторы можно можно ресуспендировать в липосомы для доставки в целевые клетки. Векторы, содержащие полинуклеотиды (например, последовательности, кодирующие вариабельный(вариабельные) домен(домены) тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулиновых цепей, и последовательности контроля экспрессии) можно переносить в клетку-хозяина при помощи подходящих способов, которые отличаются в зависимости от типа клетки-хозяина.

Модификации.

Антитела или их антигенсвязывающие участки по настоящему раскрытию можно модифицировать детектируемой меткой или детектируемым фрагментом, в том числе без ограничений ферментом, простетической группой, флуоресцентным веществом, люминесцентным веществом, биолюминесцентным веществом, радиоактивным веществом, позитрон-активным металлом, ионом нерадиоактивного парамагнитого металла и аффинной меткой для детекции и выделения комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и/или комплекса LRRC33-TGFβ1. Детектируемое вещество или фрагмент можно объединить или конъюгировать непосредственно с полипептидами по настоящему раскрытию или опосредованно при помощи посредника (такого как, например, линкер (например, расщепляемый линкер)) с применением подходящих методик. Неограничивающие примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β-галактозидазу, глюкозооксидазу или ацетилхолинэстеразу; неограничивающие примеры подходящих комплексов на основе простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; неограничивающие примеры подходящих флуоресцентных веществ включают биотин, умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансил хлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного вещества включает люминол; неограничивающие примеры биолюминесцентных веществ включают люциферазу, люциферин и экворин; и примеры подходящего радиоактивного вещества включают ион радиоактивного металла, например, альфа-излучатели или другие радиоизотопы, такие как, например, йод (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^{3}H), индий (^{115}mIn, ^{113}mIn, ^{112}In, ^{111}In) и технеций (^{99}Tc, ^{99}mTc), таллий (^{201}Ti), галлий (^{68}Ga, ^{67}Ga), палладий (^{103}Pd), молибден (^{99}Mo), ксенон (^{133}Xe), фтор (^{18}F), ^{153}Sm, Lu, ^{159}Gd, ^{149}Pm, ^{140}La, ^{175}Yb, ^{166}Ho, ^{90}Y, ^{47}Sc, ^{86}R, ^{188}Re, ^{142}Pr, ^{105}Rh, ^{97}Ru, ^{68}Ge, ^{57}Co, ^{65}Zn, ^{85}Sr, ^{32}P, ^{153}Gd, ^{169}Yb, ^{51}Cr, ^{54}Mn, ^{75}Se и олово (^{113}Sn, ^{117}Sn). Детектируемое вещество можно объединить или конъюгировать непосредственно с антителами по настоящему раскрытию, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, или косвенно при помощи посредника (такого как, например, линкер) с применением подходящих методик. Любое из антител, предусматриваемых в настоящем документе, которые конъюгируют с детектируемым веществом, можно применять для любых подходящих диагностических анализов, таких как таковые, описываемые в настоящем документе.

Помимо этого, антитела или их антигенсвязывающие участки по настоящему раскрытию также можно модифицировать лекарственным средством. Лекарственное средство можно объединить или конъюгировать непосредственно с полипептидами по настоящему раскрытию или опосредованно при помощи посредника (такого как, например, линкер (например, расщепляемый линкер)) с применением подходящих методик.

Таргетные средства.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие предусматривает применение таргетных средств для целенаправленного воздействия на антитело или его антигенсвязывающий участок, как раскрывается в настоящем документе, по отношению к определенному участку у субъекта в целях модулирования высвобождения зрелого TGFβ из комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и/или комплекса LRRC33-TGFβ1. Например, комплексы LTBP1-TGFβ1 и LTBP3-TGFβ1 обычно располагаются по направлению к внеклеточному матриксу. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела, раскрываемые в настоящем документе, можно конъюгировать с таргетными средствами внеклеточного матрикса в целях расположения антител по направлению к участкам, где находятся комплексы LTBP1-TGFβ1 и LTBP3-TGFβ1. В соответствии с такими вариантами осуществления селективное целенаправленное воздействие антител приводит к селективной модуляции комплексов LTBP1-TGFβ1 и/или LTBP3-TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления селективное целенаправленное воздействие антител приводит к селективному ингибированию комплексов LTBP1-TGFβ1 и/или LTBP3-TGFβ1 (например, в целях лечения фиброза). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления таргетные средства

внеклеточного матрикса включат средства, связывающие гепарин, средства, связывающие матричную металлопротеиназу, домены, связывание лизилоксидазу, средства, связывающие фибриллин, средства, связывающие гиалуроновую кислоту и др.

Аналогичным образом, комплексы GARP-TGFβ1 обычно располагаются по направлению к поверхности клеток, например, активированных $FOXP3^+$ регуляторных Т-клеток (Treg). Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела, раскрываемые в настоящем документе, можно конъюгировать со связывающими средствами иммунных клеток (например, Treg-клеток) в целях расположения антител по направлению к участкам, в которых находятся комплексы GARP-TGFβ1. В соответствии с такими вариантами осуществления селективное целенаправленное воздействие антител приводит к селективной модуляции комплексов GARP-TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления селективное целенаправленное воздействие антител приводит к селективному ингибированию комплексов GARP-TGFβ1 (например, селективному ингибированию высвобождения зрелого TGFβ1 в целях иммунной модуляции, например, при лечении злокачественной опухоли). В соответствии с такими вариантами осуществления таргетные средства Treg-клеток могут включать в себя, например, белки CCL22 и CXCL12 или их фрагменты.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления можно использовать биспецифические антитела, имеющие первый участок, который селективно связывает комплекс GARP-TGFβ1 и комплекс LTBP-TGFβ1, и второй участок, который селективно связывает компонент целевого участка, например, компонент ECM (например, фибриллин) или компонент Treg-клетки (например, CTLA-4).

Фармацевтические композиции.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает фармацевтические композиции, применяемые в качестве лекарственного препарата, подходящего для введения у субъектов-людей и отличных от человека субъектов. Одно или несколько антител, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, можно приготовить или смешать с фармацевтически приемлемым носителем (наполнителем), в том числе, например, буфером, с получением фармацевтической композиции. Такие лекарственные формы можно применять для лечения заболевания или нарушения, которое включает передачу сигнала с участием TGFβ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое заболевание или нарушение, ассоциированное с передачей сигнала с участием TGFβ, включает в себя один или несколько контекстов, т.е., TGFβ ассоциирован с определенным типом или типами представляющих молекул. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такой контекст возникает специфическим по отношению к типу клетки и/или тканеспецифическим образом. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое такой контекстно-зависимый процесс передачи сигнала с участием TGFβ опосредована отчасти посредством GARP, LRRC33, LTBP1 и/или LTBP3.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело по настоящему изобретению специфически связывается с двумя или более контекстами TGFβ таким образом, что антитело связывает TGFβ в комплексе с представляющими молекулами, выбранными из двух или более из GARP, LRRC33, LTBP1 и LTBP3. Таким образом, такие фармацевтические композиции можно вводить пациентам для облегчения TGFβ-ассоциированного показания (например, фиброза, иммунных нарушений и/или злокачественной опухоли). "Приемлемый" означает, что носитель совместим с действующим веществом композиции (и предпочтительно способен стабилизировать активный компонент) и не вреден для субъекта, подлежащего лечению. Примеры фармацевтически приемлемых наполнителей (носителей), в том числе буферы, будут понятны специалисту в данной области и были описаны ранее. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20^{th} Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover. В одном примере фармацевтическая композиция, описываемая в настоящем документе, содержит более одного антитела, которое специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, где антитела распознают различные эпитопы/остатки комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и/или комплекса LRRC33-TGFβ1.

Фармацевтические композиции, подлежащие применению в способах настоящего изобретения, могут содержать фармацевтически приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы в форме лиофилизированных лекарственных форм или водных растворов (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20^{th} Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover). Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях, и могут представлять собой буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, в том числе аскорбиновая кислота и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (имеющие менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидро-

фильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкоза, манноза или декстраны; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/и неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG). Фармацевтически приемлемые наполнители дополнительно описаны в настоящем документе.

В некоторых примерах фармацевтическая композиция, описываемые в настоящем документе, содержит липосомы, содержащие антитело, которое специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, которое можно получить при помощи любого подходящего способа, такого как описан в Epsteinet al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); и патенты США № № 4485045 и 4544545. Липосомы с повышенным временем нахождения в кровотоке раскрыты в патенте США № 5013556. Особенно применимые липосомы можно получить пи помощи метода обращенно-фазового выпаривания с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и PEG-дериватизированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE). Липосомы экструдируют при помощи фильтров с определенным размером пор с получением липосом с предпочтительным диаметром.

Антитела, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, можно также захватывать в микрокапсулы, приготовленные, например, при помощи методик коацервации или при помощи полимеризации на границе раздела фаз, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметцилатные) микрокапсулы соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и нанокапсулах) или в макроэмульсиях. Иллюстративные методики были описаны ранее, см., например, Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

В других примерах фармацевтическую композицию, описываемую в настоящем документе, можно приготовить в формате с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, при этом матрицы находятся в форме изделий определенной формы, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметилкрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и 7 этил-L-глутамата, не поддающийся разложению этилен-винилацетат, поддающиеся разложению сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и лейпролида ацетата), изобутират ацетата сахарозы и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота.

Фармацевтические композиции, подлежащие применению для введения in vivo, должны быть стерильными. Этого легко можно достичь, например, при помощи фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны. Композиции на основе терапевтических антител, как правило, помещают в контейнер, имеющий стерильный порт доступа, например, мешок с раствором для внутривенных инъекций или флакон, имеющий пробку, прокалываемую гиподермической иглой для инъекций.

Фармацевтические композиции, описываемые в настоящем документе, могут находиться в форме единичной лекарственной формы, такой как таблетки, пилюли, капсулы, порошки, гранулы, растворы, суспензии или суппозитории для перорального, парентерального или ректального введения или введения путем ингаляции или инсуффляции.

Для приготовления твердых композиций, таких как таблетки, основное действующее вещество можно смешать с фармацевтическим носителем, например, традиционными компонентами для таблетирования, такими как кукурузный крахмал, лактоза, сахароза, сорбит, тальк, стеариновая кислота, стеарат магния, дикальцийфосфат или смолы, и другие фармацевтические разбавители, например, вода, с образованием твердой композиции до придания ей лекарственной формы, содержащей гомогенную смесь соединения по настоящему раскрытию или ее нетоксичную фармацевтически приемлемую соль. При отсылке на такие композиции до придания им лекарственной формы в виде гомогенных подразумевается, что действующее вещество диспергировано равномерно в композиции таким образом, что композицию можно легко подразделить на равноэффективные единичные лекарственные формы, такие как таблетки, пилюли и капсулы. Такую твердую композицию до придания ей лекарственной формы затем подразделяют на единичные лекарственные формы типа, описываемого выше, содержащие от 0,1 мг до приблизительно 500 мг действующего вещества по настоящему раскрытию. Таблетки или пилюли новой композиции можно покрыть или иным образом компаундировать с получением лекарственной формы, обеспечивающей преимущество пролонгированного действия. Например, таблетка или пилюля может содержать внутренний слой, содержащий действующее вещество и наружный слой, содержащий действующее вещество, при этом второй находится в форме оболочки над первым. Эти два слоя можно разде-

лить энтеросолюбильным слоем, который предназначен для защиты от растворения в желудке и способствует прохождению внутреннего слоя, содержащего действующее вещество, интактным в двенадцатиперстной кишке или замедлению его высвобождения. Для таких энтеросолюбильных слоев или оболочек можно использовать ряд веществ, при этом такие вещества включают в себя ряд полимерных кислот и смесей полимерных кислот с такими веществами, как шеллак, цетиловый спирт и ацетилцеллюлоза.

Подходящие поверхностно-активные вещества включают в себя, в частности, неоинные средства, такие как полиоксиэтиленсорбитаны (например, Tween™ 20, 40, 60, 80 или 85) и другие сорбитаны (например, Span™ 20, 40, 60, 80 или 85). Композиции с поверхностно-активным веществом будут в целях удобства содержать от 0,05 до 5% поверхностно-активного вещества и могут содержать от 0,1 до 2,5%. Следует принимать во внимание, что при необходимости можно добавлять другие компоненты, например, маннит или другие фармацевтически приемлемые носители.

Можно приготовить подходящие эмульсии при помощи коммерчески доступных жировых эмульсий, таких как Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ и Lipiphysan™. Действующее вещество можно растворять в предварительно смешанной эмульсионной композиции или альтернативно его можно растворять в масле (например, соевом масле, сафлоровом масле, хлопковом масле, кунжутном масле, кукурузном масле или миндальном масле) и образованной эмульсии при смешивании с фосфолипидом (например, фосфолипидами яйца, фосфолипидами соевых бобов или лецитином соевых бобов) и водой. Следует принимать во внимание, что можно добавлять другие компоненты, например, глицерин или глюкозу, в целях регуляции тоничности эмульсии. Подходящие эмульсии обычно будут содержать до 20% масла, например, от 5 до 20%.

Эмульсионные композиции могут представлять собой таковые, приготовленные в результате смешивания антитела, которое специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1 с Intralipid™ или его компонентами (соевым маслом, фосфолипидами яйца, глицерином и водой).

Фармацевтические композиции для ингаляции или инсуффляции включают в себя растворы и суспензии в фармацевтически приемлемых, водных или органических растворителях или их смесях, и порошки. Жидкие или твердые композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые наполнители, как изложено выше. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления для местного или системного эффекта композиции вводят пероральным или назально-респираторным путем.

Композиции в предпочтительно стерильных фармацевтически приемлемых растворителях можно распылять с применением газов. Распыляемые растворы можно вдыхать из распыляющего устройства или распыляющее устройство может быть прикреплено к дыхательной маске, дилататору или дыхательному аппарату с перемежающейся вентиляцией с положительным давлением. Композиции на основе раствора, суспензии или порошка можно вводить предпочтительно перорально или назально, из устройств, которые доставляют лекарственную форму подходящим образом.

Применение антител и их антигенсвязывающих участков, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела, их антигенсвязывающие участки и композиции по настоящему раскрытию можно применять для лечения самых различных заболеваний, нарушений и/или состояний. В некоторых случаях такие заболевания, нарушения и/или состояния могут представлять собой TGFβ-ассоциированные показания. Используемый в настоящем документе термин "TGFβ-ассоциированное показание" относится к любому заболеванию, нарушению и/или состоянию, связанному с экспрессией, активностью и/или метаболизмом белка, являющегося членом семейства TGFβ, и любым заболеванием, нарушением и/или состоянием, для которого извлекается преимущество от модуляции активности и/или уровней одного или нескольких белков, являющихся членами семейства TGFβ. TGFβ-ассоциированные показания могут включать в себя без ограничения фиброз, злокачественную опухоль (в том числе без ограничения злокачественную опухоль толстой кишки, злокачественную опухоль прямой кишки, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную меланому и глиобластому), облегчение быстрого гемопоэза после химиотерапии, срастание перелома, заживление ран, деменцию, миелофиброз, болезнь почек, одностороннюю обструкцию мочеточника (UUO), выпадение и/или дегенерацию зубов, синдромы пролиферации эндотелия, астму и аллергию, желудочно-кишечные нарушения, анемию людей пожилого возраста, аневризму аорты, орфанные показания (такие как синдром Марфана и болезнь Камурати-Энгельманна), ожирение, сахарный диабет, артрит, рассеянный склероз, мышечную дистрофию, амиотрофический латеральный склероз (ALS), болезнь Паркинсона, остеопороз, остеоартроз, остеопению, метаболические синдромы, нарушения питания, атрофию органов, хроническую обструктивную болезнь легких (COPD) и анорексию. Дополнительные показания могут включать в себя любое из таковых, раскрытых в публикации США № 2013/0122007, патенте США № 8415459 или международной публикации № WO 2011/151432, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Фиброз.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела и/или композиции по настояще-

му раскрытию могут быть применимы в целях изменения фиброза. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие антитела и/или композиции являются антагонистами TGFβ (например, TGFβ1). TGFβ1 признан основным регулятором фиброзного ответа. Во многих доклинических моделях антитела, целенаправленно воздействующие на TGFβ1, уменьшают фиброз. Такие антитела и/или соединения на основе антител включают в себя LY2382770 (Eli Lilly, Индианаполис, Индиана). Также включены таковые, описанные в патентах США № US 6492497, US 7151169, US 7723486 и публикации заявки на патент США № 2011/0008364, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Фиброзные показания, для которых антитела и/или композиции по настоящему раскрытию можно применять терапевтически, включают в себя без ограничения показания, связанные с болезнями легких (например, идиопатический легочный фиброз (IPF), хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), аллергическую бронхиальную астму, острое повреждение легких, эозинофильный эзофагит, легочную артериальную гипертензию и химическое повреждение газами), показания, связанные с болезнями почек (например, диабетический гломерулосклероз, фокальный сегментарный гломерулосклероз (FSGS), хроническая болезнь почек, фиброз, ассоциированный с пересадкой и хроническим отторжением почки, IgA-нефропатия и гемолитический уремический синдром), фиброз печени (например, неалкогольный стеатогепатит (NASH), хронический вирусный гепатит, паразитемию, врожденные нарушения обмена веществ, опосредованный токсинами фиброз, такой как алкогольный фиброз, неалкогольный стеатогепатит-гепатоцеллюлярную карциному (NASH-HCC), первичный билиарный цирроз и склерозирующий холангит), сердечно-сосудистый склероз (например, кардиомиопатию, гипертрофическую кардиомиопатию, атеросклероз и рестеноз), системный склероз, фиброз кожи (например, фиброз кожи при системном склерозе, диффузный кожный системный склероз, склеродермия, патологическое рубцевание кожи, келоид, послеоперационное рубцевание, операцию по коррекции рубца, индуцируемое излучением рубцевание и хронические раны) и злокачественные опухоли или вторичный фиброз (например, миелофиброз, злокачественную опухоль головы и шеи, острый мегакариобластный лейкоз (M7) и мукозит). Другие заболевания, нарушения и состояния, связанные с фиброзом, которые можно лечить при помощи соединений и/или композиций по настоящему раскрытию, включают в себя без ограничения синдром Марфана, синдром жесткой кожи, склеродермию, ревматоидный артрит, фиброз костного мозга, болезнь Крона, язвенный колит, системную красную волчанку, мышечную дистрофию (такую как DMD), контрактуру Дюпюитрена, синдром Камурати-Энгельманна, рубцевание нервной ткани, деменцию, пролиферативную витреоретинопатию, повреждение роговицы, осложнения после операции по установлению дренажа при глаукоме и рассеянный склероз. Многие такие фиброзные показания также ассоциированы с воспалением пораженной (пораженных) ткани (тканей), включающим вовлечение иммунного компонента.

Для лечения фиброза можно применять антитела, описываемые в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления специфические по отношению к изоформам TGFβ1 средства вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения фиброза. Эффективное количество такого антитела представляет собой количество, эффективное для достижения как терапевтической эффективности, так и клинической безопасности у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое антитело представляет собой контекстно-специфическое антитело, которое может блокировать активацию TGFβ1, которая опосредована содержащим LTBP ECM-ассоциированным TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления LTBP представляет собой LTBP1 и/или LTBP3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело представляет собой контекстно-пермиссивное антитело, которое блокирует активацию LTBP-опосредованного TGFβ1, локализованного в ECM, и GARP-опосредованного TGFβ1, локализованного в иммунных клетках. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело представляет собой контекстно-пермиссивное антитело, которое блокирует активацию LTBP-опосредованного TGFβ1, локализованного в ECM, и LRRC33-опосредованного TGFβ1, локализованного в моноцитах/макрофагах. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления LTBP представляет собой LTBP1 и/или LTBP3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целенаправленное воздействие на TGFβ1 и его ингибирование, представляемое LRRC33 по отношению к профиброзным M2-подобным макрофагам в фиброзном микроокружении, может быть предпочтительным.

Анализы, пригодные при определении эффективности антител и/или композиций по настоящему раскрытию, включают в себя без ограничения гистологические анализы для подсчета фибробластов и основные иммуногистохимические анализы, известные в данной области.

Злокачественная опухоль.

Различные злокачественные опухоли можно лечить антителами и/или композициями по настоящему раскрытию. Используемый в настоящем документе термин "злокачественная опухоль" относится к любому из различных злокачественных новообразований, характеризующихся пролиферацией анапластических клеток, которые склонны инвазировать окружающую ткань и метастазировать в новые участки организма, а также относится к патологическому состоянию, характеризующемуся такими разраста-

ниями злокачественных новообразований. Злокачественные опухоли могут представлять собой опухоли или гематологические злокачественные новообразования, и включают в себя без ограничений все типы лимфом/лейкозом, карцином и сарком, таких как злокачественные опухоли и опухоли, встречающиеся в анальном отверстии, мочевом пузыре, желчном протоке, костной ткани, головном мозге, молочной железе, шейке матки, толстой кишке/прямой кишке, эндометрии, пищеводе, глазе, желчном пузыре, голове и шее, печени, почке, гортани, легком, средостении (грудной клетке), ротовой полости, яичниках, поджелудочной железе, мужском половом члене, предстательной железе, коже, тонком кишечнике, желудке, спинном мозге, копчике, семенниках, щитовидной железе и матке.

При злокачественной опухоли TGFβ (например, TGFβ1) может как оказывать активирующее действие на рост, так и ингибирующее действие на рост. Например, при злокачественных опухолях поджелудочной железы опухоли, вызванные SMAD4 дикого типа, могут претерпевать ингибирующий рост в ответ на TGFβ, однако по мере того, как заболевание прогрессирует, то обычно присутствует конститутивно активированный рецептор II типа. Кроме того, существуют SMAD4-нулевые злокачественные опухоли поджелудочной железы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела, их антигенсвязывающие участки и/или композиции по настоящему раскрытию конструируют в целях селективного целенаправленного воздействия на компоненты путей передачи сигнала с участием TGFβ, которые функционируют однозначно при одной или нескольких формах злокачественной опухоли. Лейкозы, или злокачественные опухоли крови или костного мозга, которые характеризуются патологической пролиферацией белых кровяных клеток, т.е., лейкоцитов, можно разделить на четыре основные группы, в том числе острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый миелогенный лейкоз, или острый миелоидный лейкоз (AML) (AML с транслокациями между хромосомой 10 и 11 [t(10,11)], хромосомой 8 и 21 [t(8;21)], хромосомой 15 и 17 [t(15;17)] и инверсиями в хромосоме 16 [inv(16)]; AML с мультилинейной дисплазией, который включает пациентов, которые ранее имели миелодиспластический синдром (MDS) или миелопролиферативный синдром, который трансформируется в AML; AML и миелодиспластический синдром (MDS) на фоне лечения, эта категория включает пациентов, которые ранее получали химиотерапию и/или лучевую терапию и у которых затем возникает AML или MDS; d) AML, не характеризующийся иным образом, который включает подтипы AML, которые не разделяются на вышеуказанные категории; и e) острые лейкозы сомнительной линии дифференцировки, которые возникают в случае, когда лейкозные клетки нельзя классифицировать ни как миелоидные, ни как лимфоидные клетки, или в случае, когда присутствуют оба типа клеток); и хронический миелогенный лейкоз (CML).

Типы карцином включают в себя без ограничения папиллому/карциному, хориокарциному, опухоль эндодермального синуса, тератому, аденому/аденокарциному, меланому, фиброму, липому, лейомиому, радбомиому, мезотелиому, ангоиму, остеому, хондрому, глиому, лимфому/лейкоз, плоскоклеточную карциному, мелкоклеточную карциному, крупноклеточные недифференцированные карциномы, базальноклеточную карциному и синоназальную недифференцированную карциному.

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

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела и способы по настоящему раскрытию можно применять для лечения одного или нескольких типов злокачественной опухоли или связанных со злокачественной опухолью состояний, которые могут включать без ограничения злокачественную опухоль толстой кишки, злокачественную опухоль прямой кишки, злокачественную опухоль почки, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную меланому и глиобластомы (Schlingensiepen et al., 2008; Ouhtit et al., 2013).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, как описано в настоящем документе, можно применять в способах лечения злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный способ предусматривает введение антитела или его антигенсвязывающего участка субъекту таким образом, что происходит лечение злокачественной опухоли. В соответствии с определенными вариантами осуществления злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль толстой кишки.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, как описано в настоящем документе, можно применять в способах лечения солидных опухолей. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления солид-

ные опухоли могут представлять собой десмопластические опухоли, которые являются обычно плотными и жесткими для проникновения терапевтических молекул. В результате целенаправленного воздействия на компонент ECM таких опухолей, такие антитела могут "разрыхлять" плотную опухолевую ткань в целях дезинтеграции, облегчая доступ лекарственных средств с оказанием противоопухолевых эффектов. Таким образом, дополнительные лекарственные препараты, такие как любые известные противоопухолевые препараты, можно использовать в комбинации.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, как описано в настоящем документе, можно применять в способах ингибирования или уменьшения роста солидной опухоли у субъекта, имеющего солидную опухоль, при этом указанный способ предусматривает введение антитела или его антигенсвязывающего участка субъекту таким образом, что рост солидной опухоли ингибируется или уменьшается. В соответствии с определенными вариантами осуществления солидная опухоль представляет собой карциному толстой кишки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки, пригодные для лечения злокачественной опухоли, представляют собой изоформно-специфический контекстно-пермиссивный ингибитор активации TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие антитела целенаправленно воздействуют на комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и комплекс a LRRC33-TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие антитела целенаправленно воздействуют на комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1 и комплекс LTBP3-TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие антитела целенаправленно воздействуют на комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и комплекс LRRC33-TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие антитела целенаправленно воздействуют на комплекс GARP-TGFβ1 и комплекс LRRC33-TGFβ1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, как описано в настоящем документе, вводят субъекту, имеющему злокачественную опухоль или опухоль, либо в отдельности либо в комбинации с дополнительным средством, например, антителом к PD-1 (например, антагонистом к PD-1). Другие комбинированные виды терапии, которые включены в настоящее изобретение, представляют собой введение антитела или его антигенсвязывающего участка, описанного в настоящем документе, совместно с лучевой терапией или химиотерапевтическим средством. Иллюстративные дополнительные средства включают в себя без ограничения антагонист PD-1, антагонист PDL1, слитый белок PD-L1 или PDL2, антагонист CTLA4, агонист GITR, антитело к ICOS, антитело к ICOSL, антитело к B7H3, антитело к B7H4, антитело к TIM3, антитело к LAG3, антитело к OX40, антитело к CD27, антитело к CD70, антитело к CD47, антитело к 41BB, антитело к PD-1, онколитический вирус и ингибитор PARP.

Роль TGFβ при состояниях, связанных со скелетными мышцами. В скелетных мышцах TGFβ играет ряд функций, в том числе ингибирование пролиферации и дифференциации, индукцию атрофии и развитие фиброза. TGFβ ослабляет пролиферацию клеток-сателлитов и предупреждает дифференциацию (посредством ингибирования MyoD и миогенина) (Allen, R.E. and L.K. J Cell Physiol, 1987. 133(3): p. 567-72; Brennan, T.J., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1991. 88 (9): p. 3822-6; Massague, J., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1986. 83(21): p. 8206-10; Olson, E.N. et al., J Cell Biol, 1986. 103 (5): p. 1799-805). Изоформа TGFβ (например, TGFβ1, 2 или 3) не определена в этих ранних исследованиях, однако, предполагается, что она представляет собой TGFβ1. TGFβ также способствует мышечному фиброзу; прямая инъекция рекомбинантного TGFβ1 приводит к фиброзу скелетных мышц, а ингибирование pan-TGFβ уменьшает фиброз мышечной ткани при остром и хроническом повреждении (Li, Y., et al., Am J Pathol, 2004. 164 (3): p. 1007-19; Mendias, C.L., et al., Muscle Nerve, 2012. 45(1): p. 55-9; Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21). TGFβ1 экспрессируется мышечными волокнами, макрофагами, регуляторными Т-клетками, фибробластами и фиброцитами в скелетной мышце (Li, Y., et al., Am J Pathol, 2004. 164(3): p. 1007-19; Lemos, D.R. et al., NatMed, 2015. 21(7): p. 786-94; Villalta, S.A. et al., Sci Transl Med, 2014. 6(258): p. 258ra142; Wang, X. et al., J Immunol, 2016. 197(12): p. 4750-4761); и экспрессия возрастает при повреждении и при заболевании (Li, Y., et al., Am J Pathol, 2004. 164(3): p. 1007-19; Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21; Bernasconi, P., et al., J Clin Invest, 1995. 96(2): p. 1137-44; Ishitobi, M., et al., Neuroreport, 2000. 11(18): p. 4033-5). TGFβ2 и TGFβ3 также активируются (на уровне мРНК) в мышечной ткани при наличии mdx, хотя в меньшей степени, чем TGFβ1 (Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21; Zhou, L. et al., Neuromuscul Disord, 2006. 16(1): p. 32-8). Pessina, et al. недавно использовали эксперименты по отслеживанию направления дифференцировки с демонстрацией того, что клетки различного происхождения в дистрофической мышечной ткани выбирают фиброгенный путь посредством TGFβ-зависимого пути (Pessina, P., et al., Stem Cell Reports, 2015. 4(6): p. 1046-60).

TGFβ1 наблюдался при мышечных дистрофиях человека. Мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) представляет собой тяжелое, прогрессирующее и в конечном итоге приводящее к летальному исходу

заболевание, вызванное отсутствием дистрофина (Bushby, K., et al., Lancet Neurol, 2010. 9(1): p. 77-93). Отсутствие дистрофина приводит к повышенной восприимчивости к повреждению, вызванному сокращением, способствуя мышечной дегенерации (Petrof, B.J., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(8): p. 3710-4; Dellorusso, C et al., J Muscle Res Cell Motil, 2001. 22(5): p. 467-75; Pratt, S.J. et al., Cell Mol Life Sci, 2015. 72(1): p. 153-64). Повторные циклы репарации способствуют хроническому воспалению, фиброзу, истощению пула клеток-сателлитов, в конечном итоге потере подвижности и гибели (Bushby, K., et al., Lancet Neurol, 2010. 9(1): p. 77-93; McDonald, C.M., et al., Muscle Nerve, 2013. 48(3): p. 343-56). Экспрессия TGFβ1 значительно повышена у пациентов с DMD и коррелирует со степенью фиброза, наблюдаемого у этих пациентов (Bernasconi, P., et al., J Clin Invest, 1995. 96(2): p. 1137-44; Chen, Y.W., et al., Neurology, 2005. 65(6): p. 826-34). Избыточное отложение ECM оказывает отрицательное влияние на сократительную способность мышечной ткани и может ограничивать доступ к питательным веществам, поскольку мышечные волокна изолированы от своего кровоснабжения (Klingler, W., et al., Acta Myol, 2012. 31(3): p. 184-95). В последнее время дополнительные данные также указали на роль TGFβ1 в мышечных дистрофиях. Было обнаружено, что варианты LTBP4 модифицируют тяжесть заболевания у мыши и человека. При исследовании у мышей было обнаружено, что вариант LTBP4 оказывает защитное действие у мышей, не имеющих дистрофина или γ-саркогликана (Coley, W.D., et al., Hum Mol Genet, 2016. 25(1): p. 130-45; Heydemann, A. et al., J Clin Invest, 2009. 119(12): p. 3703-12). При исследовании у человека было обнаружено, что в двух группах независимо выявлялся вариант LTBP4 в качестве защитного при DMD, замедляя потерю способности передвигаться не несколько лет (Flanigan, K.M., et al., Ann Neurol, 2013. 73(4): p. 481-8; van den Bergen, IC, et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2015. 86(10): p. 1060-5). Несмотря на то, что природа генетических вариантов у мыши и человека отличается, у обоих видов защитный вариант приводит к сниженной передачи сигнала с участием TGFβ (Heydemann, A., et al., J Clin Invest, 2009. 119(12): p. 3703-12); Ceco, E., et al., Sci Transl Med, 2014. 6(259): p. 259ral44). Многие из функций TGFβ1 в биологии скелетных мышц были определены в результате экспериментов, в которых очищенный активный фактор роста вводили животным или добавляли к клеткам в культуре (Massague, J., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1986. 83(21): p. 8206-10; Li, Y., et al., Am J Pathol, 2004. 164(3): p. 1007-19; Mendias, C.L., et al., Muscle Nerve, 2012. 45(1): p. 55-9). Учитывая важность клеточного контекста для специфических функций TGFβ1 (см., например, Hinck et al., Cold Spring Harb. Perspect. Biol, 2016. 8(12)), возможно, что некоторые из эффектов, наблюдаемых в этих экспериментах, не отражают эндогенную (эндогенные) функцию (функции) этого цитокина in vivo. Например, обработка фибробластов дермы человека рекомбинантным TGFβ1, миостатином или GDF11 приводит к почти одинаковым изменениям в экспрессии генов в этих клетках, несмотря на то, что функции этих белков in vivo весьма отличаются (Tanner, J.W., Khalil, A., Hill, J., Franti, M., MacDonnell, S.M., Growth Differentiation Factor 11 Potentiates Myofibroblast Activation, в Fibrosis: From Basic Mechanisms to Targeted therapies. 2016: Keystone, CO).

Многие исследователи использовали ингибиторы TGFβ для выяснения функции этого фактора роста in vivo. Обработка мышей с наличием mdx нейтрализующим антителом к pan-TGFβ 1D11 отчетливо приводит к уменьшению фиброза (на основе гистологического анализа и содержания гидроксипролина), уменьшению мышечного повреждения (сниженное содержание сывороточной креатинкиназы и повышенная плотность мышечных волокон) и улучшенной мышечной функции (по результатам плетизмографии, генерации силы изолированными EDL-мышцами и повышенной силе захватывания передними конечностями) (Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21; Andreetta, F. et al., J Neuroimmunol, 2006. 175(1-2): p. 77-86; Gumucio, J.P. et al., J Appl Physiol (1985), 2013. 115(4): p. 539-45). Кроме того, специфическая по отношению к мышечным волокнам экспрессия доминантно-негативного рецептора TGFβ II типа оказывает защитное действие от мышечного разрушения после кардиотоксического повреждения и у δ-саркогликан-/- мышей (Accornero, F., et al., Hum Mol Genet, 2014. 23(25): p. 6903-15). Протеогликан декорин, который находится в избытке в скелетных мышцах и ингибирует активность TGFβ, уменьшает мышечный фиброз у мышей с наличием mdx и после повреждения вследствие разрыва (Li, Y., et al., Mol Ther, 2007. 15(9): p. 1616-22; Gosselin, L.E., et al., Muscle Nerve, 2004. 30(5): p. 645-53). Другие молекулы с ингибирующей активность по отношению к TGFβ, такие как сурамин (антинеопластическое средство) и лозартан (блокатор ангиотензинового рецептора) были эффективны в нормализации патологии мышечной ткани и уменьшении фиброза в моделях повреждения у мышей, при синдроме Марфана и мышечной дистрофии (Spurney, C.F., et al., J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011. 16(1): p. 87-95; Taniguti, A.P. et al., Muscle Nerve, 2011. 43(1): p. 82-7; Bedair, H.S., et al., Am J Sports Med, 2008. 36(8): p. 1548-54; Cohn, R.D., et al., Nat Med, 2007. 13(2): p. 204-10). Несмотря на то, что все из терапевтических средств, описываемых выше, ингибируют TGFβ1 или передачу сигнала с его участием, ни одно из них не является специфическим для изоформы TGFβ1. Например, 1D11 связывается с изоформами TGFβ1, 2 и 3 и ингибирует их (Dasch, J.R., et al., J Immunol, 1989. 142(5): p. 1536-41). Сурамин ингибирует способность нескольких факторов роста связываться со своими рецепторами, в том числе PDGF, FGF и EGF, помимо TGFβ1 (Hosang, M., J Cell Biochem, 1985. 29(3): p. 265-73; Olivier, S. et al., Eur J Cancer, 1990. 26(8): p. 867-71; Scher, H.I. and W.D. Heston, Cancer Treat Res, 1992. 59: p. 131-51). Декорин также ингибирует активность миостатина, как в результате прямого связывания, так и посредством активации фоллистатина,

ингибитора миостатина (Miura, T., et al., Biochem Biophys Res Commun, 2006. 340(2): p. 675-80; Brandan, E., C Cabello-Verrugio, and C Vial, Matrix Biol, 2008. 27(8): p. 700-8; Zhu, 1, et al., J Biol Chem, 2007. 282(35): p. 25852-63). Лозартан влияет на дополнительные пути передачи сигнала в результате его эффектов на ренин-ангиотензин-альдостероновую систему, в том числе путь с участием IGF-1/AKT/mTOR (Burks, T.N., et al., Sci Transl Med, 2011. 3(82): p. 82ra37; Sabharwal, R. and M.W. Chapleau, Exp Physiol, 2014. 99(4): p. 627-31; McIntyre, M., et al., Pharmacol Ther, 1997. 74(2): p. 181-94). Таким образом, все из этих препаратов ингибируют дополнительные молекулы, которые могут способствовать их терапевтических эффектам, а также токсичности.

Учитывая предполагаемую роль TGFβ в гомеостазе, репарации и регенерации мышечной ткани, средства, такие как моноклональные антитела, описываемые в настоящем документе, которые селективно модулируют передачу сигнала с участием TGFβ1, могут быть эффективны для лечения поврежденных мышечных волокон, например, при хронических/наследственных мышечных дистрофиях и острых мышечных повреждениях, не приводя к токсичности, ассоциированной с ингибиторами TGFβ более широкого спектра действия, разработанных к настоящему времени.

Соответственно, настоящее изобретение предусматривает способы лечения поврежденных мышечных волокон с применением средства, которое предпочтительно модулирует подгруппу, но не все из эффектов TGFβ in vivo. Такие средства могут селективно модулировать передачу сигнала с участием TGFβ1 ("изоформно-специфическая модуляция"). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие средства могут дополнительно селективно модулировать TGFβ1 в конкретном контексте ("контекстно-специфическая модуляция").

Репарация мышечных волокон при хронических мышечных дистрофиях. Настоящее изобретение предусматривает способы улучшения качества и функционирования мышечной ткани у пациентов с DMD, в результате ограничения фиброза и содействия нормализации морфологии и функционирования мышечной ткани. Поскольку TGFβ1 также ингибирует миогенез, то блокада TGFβ1 может способствовать регенерации дистрофической мышечной ткани, при этом добавляется дополнительный терапевтический эффект. Ингибиторы TGFβ1 можно использовать в комбинации с препаратами, направленными на активацию дистрофина, такими как Эксондис 51 (Этеплирсен). Учитывая потенциальные терапевтические эффекты ингибирования TGFβ1 при мышечной дистрофии, важным является (1) разграничить функцию (функции) TGFβ1 от таковых TGFβ2 и TGFβ3, и (2) выяснить, в каком (каких) молекулярном (молекулярных) контексте (контекстах) ингибирование TGFβ1 было бы наиболее эффективным. Как было упомянуто выше, ингибиторы pan-TGFβ были ассоциированы со значительной токсичностью, ограничивая клиническое применение этих соединений (Anderton, M.J., et al., Toxicol Pathol, 2011. 39(6): p. 916-24; Stauber, A., et al., Clinical Toxicology, 2014. 4(3): p. 1-10). Неясно, какая из этих изоформ TGFβ вызывает эту токсичность. Некоторые из описываемых видов токсичности могут возникать благодаря ингибированию TGFβ1 в иммунной системе. Например, несмотря на то, что 1D11 значительно снижает уровни фиброза в диафрагме, лечение также повышает содержание $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток в мышечной ткани, свидетельствуя о повышенном воспалительном ответе в ответ на ингибирование pan-TGFβ, которое могло оказывать отрицательный эффект при длительном лечении (Andreetta, F., et al., J Neuroimmunol, 2006. 175(1-2): p. 77-86). Фактически истощение Т-клеток в мышечной ткани нормализует патологию мышечной ткани у мышей с наличием mdx, свидетельствуя о том, что опосредованные Т-клетками воспалительные реакции оказывают отрицательное воздействие на дистрофическую мышечную ткань (Spencer, M.J., et al., Clin Immunol, 2001. 98(2): p. 235-43). Повышение количества Т-клеток при введении 1D11 происходит, по-видимому, благодаря эффектам TGFβ1 на регуляторные Т-клетки (Treg). Treg представляют TGFβ1 на своей клеточной поверхности посредством GARP, и высвобождение TGFβ1 из этого комплекса усиливает супрессорную активность Treg, таким образом, ограничивая опосредованное Т-клетками воспаление (Wang, R., et al., Mol Biol Cell, 2012. 23(6): p. 1129-39; Edwards, J.P., A.M. Thornton, and E.M. Shevach, J Immunol, 2014. 193(6): p. 2843-9; Nakamura, K., et al., J Immunol, 2004. 172(2): p. 834-42; Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, J Exp Med, 2001. 194(5): p. 629-44). Фактически, истощение Treg при применении антитела PC61 приводило к повышенному воспалению и повреждению мышечной ткани в диафрагме мышей с наличием mdx, в то время как повышение числа и активности Treg приводило к ослаблению повреждения мышечной ткани (Villalta, S.A., et al., Sci Transl Med, 2014. 6(258): p. 258ra142). Интересным является то, что недавно была идентифицирована дополнительная популяция иммуносупрессорных Т-клеток, Tr1-клетки. Эти клетки продуцируют большие количества TGFβ3, который требуется для его супрессорной активности (Gagliani, N., et al., Nat Med, 2013. 19(6): p. 739-46; Okamura, T., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2009. 106(33): p. 13974-9; Okamura, T., et al., Nat Commun, 2015. 6: p. 6329). Несмотря на то, что функция Tr1-клеток неизвестна, существует возможность того, что ингибирование как TGFβ1, так и TGFβ3 со стороны 1D11, могло оказывать дополнительные провоспалительные эффекты в результате ингибирования как Treg-клеток, так и Tr1-клеток.

Структурные представления, описываемые выше в отношении латентности и активации TGFβ1, обеспечивают новые подходы для разработки лекарственных средств, которые специфически целена-

правленно воздействуют на активацию TGFβ1 (Shi, M., et al., Nature, 2011. 474(7351): p. 343-9). Высокая степень идентичности последовательностей, общих для трех зрелых факторов роста TGFβ, не является общей для латентных комплексов, способствуя разработке антител, которые являются высокоспецифическими по отношению к proTGFβ1. Применяя запатентованные подходы к разработке антител, авторы настоящего изобретения идентифицировали антитела (Ab1 и Ab2), которые специфически связываются с proTGFβ1 (фиг. 18A). При помощи системы кокультивирования in vitro, было показано, что эти антитела ингибируют опосредованное интегрином высвобождение TGFβ1. В этой системы, фибробласты, происходящие из кожи человека или скелетных мышц мыши, являются источником латентного TGFβ1, клеточная линия, экспрессирующая αVβ6, обеспечивает высвобождение активного TGFβ1, который затем измеряют при помощи третьей клеточной линии, экспрессирующей восприимчивый к SMAD2/3 люциферазный репортер (фиг. 11A-C). Одно из этих антител, Ab1, исследовали in vivo и оно показало эффективность в модели UUO (односторонней обструкции мочеточника) фиброза почек у мышей. В этой модели обработка мышей (n=10) Ab1 в дозе 9 мг/кг/неделю предотвращала активацию TGFβ1-восприимчивых генов (фиг. 15) и снижала степень фиброза после повреждения (на основе окрашивания пикросириусом красным) (фиг. 16). TGFβ1-специфические препараты могут иметь улучшенные профили эффективности и безопасности по сравнению с ингибиторами рап-TGFβ, что является важным аспектом, который бы длительно использовался, как в популяции с DMD. Ингибирующие антитела к TGFβ1 можно применять для определения того, является ли специфическое ингибирование TGFβ1 перспективным в качестве лекарственного препарата для лечения DMD или других мышечных заболеваний, и для выяснения функции TGFβ1 в регенерации скелетных мышц.

Хронические и острые повреждения мышечных волокон и выбор оптимальных лекарственных препаратов.

Считается, что в здоровой, но регенерирующей мышечной ткани после острого повреждения (такого как травматическое повреждение в ином отношении здоровых мышцах или двигательных нейронах), изначальная инфильтрация воспалительных макрофагов требуется для очистки поврежденной ткани и секреции факторов (например, цитокинов), необходимых для активации клеток-сателлитов. Затем эти клетки переключаются к фенотипу M2 в целях регуляции заживления раны.

В отличие от этого, при хронических состояниях, таких как заболевания, включающие DMD, провоспалительные макрофаги преобладают в течение всего времени, и такое переключение к M2 не происходит (или по меньшей мере является недостаточно эффективным), и провоспалительные макрофаги продолжают регулировать воспаление и мышечное повреждение. При DMD путь с участием NFκB является постоянно активным, приводя к конститутивному воспалению. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибитор NFκB можно вводить пациентам с DMD в целях снижения хронического воспаления.

Таким образом, при хронических состояниях, таких как DMD, терапевтический фокус может быть направлен на репарацию мышц, а не на регенерацию мышц. Это происходит потому, что мышечные волокна при DMD являются нарушенными, но не разрушенными, - они разрушаются в результате разрывов в оболочке, дисрегуляции кальциевых транзиентов и повреждения ROS макрофагов. По сравнению с этим, в случаях повреждений здоровых мышц терапевтический фокус может быть направлен на регенерацию. Например, в моделях с применением кардиотоксинов мышечные волокна уничтожаются и подлежат регенерации. Это стимулирует процесс восстановления после травматического повреждения, такого как размозжение.

Факты указывают на то, что LRRC33 экспрессируется в индуцированных тиогликоллатом перитонеальных макрофагах, которые имеют M2-подобный фенотип (характеризующийся тем, что они экспрессируют высокие уровни аргиназы, не экспрессируют iNOS и экспрессируют высокие уровни CD206).

В ситуации, когда LRRC33 экспрессируется преимущественно на M2-клетках и где его представление TGFβ1 ("контекст") является важным для пролечебного ранозаживляющего эффекта этих клеток, может быть предпочтительным активация LRRC33-опосредованного TGFβ1 в целях активации репарации и/или миогенеза. С другой стороны, в ситуациях, где LRRC33 также экспрессируется на провоспалительных M1-клетках, может быть предпочтительным ингибирование LRRC33-опосредованного TGFβ1, учитывая, что воспаление регулирует фиброз, особенно в условиях дистрофии, такой как DMD. Таким образом, идентификация источника/контекста ассоциированного с заболеванием TGFβ1 может быть важным этапом в выборе соответствующего модулятора передачи сигнала с участием TGFβ, который будет представлять информацию о том, какой уровень селективности должен учитываться (например, изоформно-специфические контекстно-пермиссивные модуляторы TGFβ1 или контекстно-специфические модуляторы TGFβ1; ингибиторы или активаторы TGFβ1 и т.д.).

Помимо хронического воспаления, отличительным признаком DMD является избыточный и прогрессирующий фиброз. При запущенном заболевании фиброз является настолько тяжелым, что при нем мышечные волокна могут фактически изолироваться от своего кровоснабжения. При нем также изменяются сократительные свойства мышцы. У людей-пациентов имеется сильная корреляция между степе-

нью активации TGFβ1 и фиброзом, и сильная связь между степенью фиброза и отрицательными последствиями, связанными с подвижностью. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибиторы LTBP-proTGFβ1 можно вводить пациентам с дистрофией для предупреждения и/или уменьшения фиброза в целях селективно целенаправленно воздействовать на ECM-ассоциированные эффекты TGFβ1 при заболевании. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления различные изоформно- и/или контекстно-селективные средства, описываемые в настоящем документе, можно применять для достижения ингибирования передачи сигнала с участием TGFβ1 в целях предупреждения фиброза и активации миогенеза, не вызывая нежелательных эффектов на иммунную систему (например, посредством GARP или LRRC33).

Лечение.

Для практического осуществления способа, раскрываемого в настоящем документе, эффективное количество фармацевтической композиции, описываемой выше, можно вводить субъекту (например, человеку), нуждающемуся в лечении, подходящим способом, таким как внутривенное введение, например, в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, при помощи внутримышечных, интраперитонеальных, интрацереброспинальных, подкожных, внутрисуставных, интрасиновиальных, интратекальных, пероральных или местных способов. Для введения пригодны коммерчески доступные лекарственные формы, в том числе, струйные небулайзеры и ультразвуковые небулайзеры. Жидкие лекарственные формы можно распылять непосредственно, а лиофилизированный порошок можно распылять после растворения. Альтернативно антитела или их антигенсвязывающие участки, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, можно использовать в аэрозольном состоянии при помощи фторуглеродной лекарственной формы и ингалятора отмеренных доз, или в ингаляционном состоянии в виде лиофилизированного и измельченного порошка.

Субъект, подлежащий лечению при помощи способов, описываемых в настоящем документе, может быть млекопитающим, более предпочтительно человеком. Млекопитающие включают в себя без ограничения сельскохозяйственных животных, животных, используемых в спорте, домашних животных, приматов, лошадей, собак, кошек мышей и крыс. Субъект-человек, который нуждается в лечении, может представлять собой пациента-человека, у которого имеется TGFβ-ассоциированное показание, который подвержен риску его наличия или у которого оно предположительно имеется, например, таковые, отмеченные выше. Субъекта, у которого имеется TGFβ-ассоциированное показание, можно идентифицировать путем стандартного медицинского обследования, например, лабораторных тестов, функциональных исследований органов, КТ-изображений или ультразвуковых исследований. Субъект, у которого предположительно имеется любое из таких показаний, может характеризоваться одним или несколькими симптомами этого показания. Субъект, у которого имеется риск наличия показания, может представлять собой субъекта, имеющего один или несколько факторов риска данного показания.

Используемые в настоящем документе термины "эффективное количество" и "эффективная доза" относятся к любому количеству или дозе соединения или композиции, которые являются достаточными для достижения предполагаемой(предполагаемых) цели(целей), т.е., желательного биологического или медицинского ответа в ткани или у субъекта при приемлемом соотношении польза/риск. Например, в соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения предполагаемая цель может представлять собой ингибирование активации TGFβ-1 in vivo с достижением клинически значимого результата, ассоциированного с ингибированием TGFβ-1. Эффективные количества варьируют, как признается специалистами в данной области, в зависимости от конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, параметров отдельного пациента, в том числе возраста, физического состояния, размера, пола и массы тела, длительности лечения, природы сопутствующей терапии (при наличии), конкретного пути введения и подобных факторов в рамках компетенции и опыта практикующего медицинского работника. Эти факторы хорошо известны специалистам в данной области и могут рассматриваться в качестве всего лишь стандартного эксперимента. В целом предпочтительно, чтобы применяли максимальную дозу отдельных компонентов или их комбинаций, т.е., максимальную безопасную дозу в соответствии с медицинской точкой зрения. Однако, специалистам в данной области будет понятно, что пациент может настаивать на более низкой дозе или переносимой дозе по медицинским причинам, по психологическим причинам или фактически по любым другим причинам.

Эмпирические факторы, такие как период полужизни, в целом будут способствовать определению дозы. Например, антител, которые совместимы с иммунной системой человека, такие как гуманизированные антитела или полностью человеческие антитела, можно применять для продления периода полужизни антитела и предупреждения атаки на антитело со стороны иммунной системы хозяина. Частоту введения можно определять и регулировать в течение хода терапии, и, как правило, но не обязательно, она основана на лечении и/или супрессии и/или нормализации и/или задержке TGFβ-ассоциированного показания. Альтернативно подходящими могут быть лекарственные формы антитела с замедленным непрерывным высвобождением, которое специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1. Различные лекарственные

формы и изделия для осуществления замедленного высвобождения будут очевидны специалисту в данной области и находятся в объеме настоящего раскрытия.

В одном примере дозы антитела, которое специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, как описано в настоящем документе, можно определить эмпирически у индивидуумов, которые выполняли одно или несколько введений антитела. Индивидуумам вводят возрастающие дозы антагониста. Для определения эффективности можно отслеживать показатель TGFβ-ассоциированного показания. Например, способы измерения повреждения мышечных волокон, репарации мышечных волокон, уровней воспаления в мышечной ткани и/или уровней фиброза в мышечной ткани хорошо известные специалистам в данной области.

Настоящее изобретение предусматривает признание того, что средства, способные модулировать стадию активации TGFβ изоформно-специфическим образом, могут обеспечивать улучшенные профили безопасности при применении в качестве лекарственного препарата. Соответственно настоящее изобретение предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают и ингибируют активацию TGFβ1, но не TGFβ2 или TGFβ3, тем самым осуществляется специфическое ингибирование передачи сигнала с участием TGFβ1 in vivo, при этом сводятся к минимуму нежелательные побочные эффекты в результате влияния на передачу сигнала с участием TGFβ2 и/или TGFβ3.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки, как описано в настоящем документе, не являются токсичными при введении субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки, как описано в настоящем документе, характеризуются сниженной токсичностью при введении субъекту по сравнению с антителом, которое специфически связывается как TGFβ1, так и с TGFβ2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки, как описано в настоящем документе, характеризуются сниженной токсичностью при введении субъекту по сравнению с антителом, которое специфически связывается как TGFβ1, так и с TGFβ3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки, как описано в настоящем документе, характеризуются сниженной токсичностью при введении субъекту по сравнению с антителом, которое специфически связывается с TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3.

Как правило, для введения любого из антител, описываемых в настоящем документе, начальная доза кандидата может составлять приблизительно 2 мг/кг. Для целей настоящего раскрытия типичная суточная доза может варьировать от приблизительно 0,1 мкг/кг до 3 мкг/кг, до 30 мкг/кг, до 300 мкг/кг, до 3 мг/кг, до 30 мг/кг, до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. Для повторных введений в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продолжается до достижения желательного подавления симптомов или до достижения достаточных терапевтических уровней, необходимых для нормализации TGFβ-ассоциированного показания или его симптомов. Иллюстративный режим дозирования предусматривает введение начальной дозы, составляющей приблизительно 2 мг/кг, за которой следует поддерживающая доза, составляющая приблизительно 1 мг/кг антитела один раз в неделю, или за которой следует поддерживающая доза, составляющая приблизительно 1 мг/кг один раз в две недели. Однако могут быть применимыми другие режимы дозирования, в зависимости от паттерна фармакокинетического распада, который хочет достичь практикующий врач. Например, предусмотрено дозирование, исходя из одного-четырех раз в неделю. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления можно применять дозу, варьирующую от приблизительно 3 мкг/мг до приблизительно 2 мг/кг (такую как, приблизительно 3 мкг/мг, приблизительно 10 мкг/мг, приблизительно 30 мкг/мг, приблизительно 100 мкг/мг, приблизительно 300 мкг/мг, приблизительно 1 мг/кг и приблизительно 2 мг/кг). Фармакокинетические эксперименты показали, что концентрация антитела, раскрываемого в настоящем документе (например, Ab2), в сыворотке остается стабильной по меньше мере в течение 7 дней после введения в доклинической модели на животных (например, модели на мыши). Не ограничиваясь какой-либо определенной теорией, полагают, что стабильность после введения может быть предпочтительной, поскольку антитело можно вводить менее часто, при этом поддерживая клинически эффективную концентрацию в сыворотке у субъекта, которому антитела вводят (например, субъекту-человеку). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частота дозирования составляет один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 4 недели, один раз в 5 недель, один раз в 6 недель, один раз в 7 недель, один раз в 8 недель, один раз в 9 недель или один раз в 10 недель; или один раз в месяц, один раз в два месяца или один раз в 3 месяца или дольше. Результативность такой терапии легко отслеживается при помощи стандартных методик и анализов. Режим дозирования (в том числе используемое антитело) может варьировать в течение времени.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления для взрослого пациента с нормальной массой тела можно вводить дозы, варьирующие от приблизительно 0,3 до 5,00 мг/кг. Определенный режим дозирования, например, доза, время и повторение, будет зависеть от конкретного индивидуума и анамнеза этого индивидуума, а также свойств отдельных средств (таких как период полужизни средства и другие соответствующие факторы).

Для целей настоящего раскрытия подходящая доза антитела, которое связывает комплекс GARP-

TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, будет зависеть от конкретного применяемого антитела (или композиций на его основе), типа и тяжести показания, вне зависимости от того, вводится ли антитело в превентивных или терапевтических целях, предшествующей терапии, анамнеза пациента и ответа на антагонист, а также усмотрения лечащего врача. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления врач будет вводить антитело, которое специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, до тех пор, пока не будет достигнута доза, которая приводит к желаемому результату. Введение антитела, которое специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, может быть непрерывным или периодическим, в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, вне зависимости от того, является цель введения профилактической или терапевтической, и других факторов, известных практикующим врачам. Введение антитела, которое специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, может быть в значительно степени непрерывным в течение предварительно выбранного периода времени или может представлять собой последовательность из распределенной во времени дозы, например, до, во время или после развития TGFβ-ассоциированного показания.

Используемый в настоящем документе термин "лечение" относится к применению или введению композиции, включающей одно или несколько активных средств, субъекту, у которого имеется TGFβ-ассоциированное показание, симптом показания или предрасположенность к показанию, с целью излечения, лечения, облегчения, ослабления, изменения, исправления, нормализации, улучшения показания, симптома показания или предрасположенности к показанию или влияния на них.

Облегчение TGFβ-ассоциированного показания антителом, которое специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, предусматривает задержку развития или прогрессирования показания или ослабления тяжести показания. Для облегчения показания не обязательно требуются терапевтические результаты. Используемый в настоящем документе термин "задержка" развития показания, ассоциированного с TGFβ-ассоциированным показанием, означает задержать, затруднить, замедлить, сдержать, стабилизировать и/или отложить прогрессирование показания. Эта задержка может быть различной продолжительности во времени, в зависимости от анамнеза показания и/или индивидуумов, подлежащих лечению. Способ, который "задерживает" или ослабляет развитие показания или задерживает начало наступления показания, представляет собой способ, который снижает вероятность развития одного или нескольких симптомов показания в определенный промежуток времени и/или уменьшает степень симптомов в определенный промежуток времени по сравнению с ситуацией, когда способ не применяется. Такие сравнения обычно основаны на клинических исследованиях с применением количества субъектов, достаточного для получения статистически значимого результата.

Мыши DBA2/J имеют делецию из 40 п.о. в аллеле LTBP4. Дисрегуляция ECM, с которым латентный TGFβ1 ассоциирован, может представлять для воздействия эпитоп, с котором связывается Ab1. Могут наблюдаться заболевания, при которых эпитоп, с которым связывается Ab1, становится представленным для воздействия, и такие заболевания могут представлять собой терапевтически противоположные состояния в отношении Ab1, если показано ингибирование TGFβ1.

Комбинированные препараты.

Настоящее раскрытие дополнительно предусматривает фармацевтические композиции и соответствующие способы, применяемые в качестве комбинированных препаратов для лечения субъектов, которые могут иметь положительный результат вследствие ингибирования TGFβ in vivo. В соответствии с любыми из этих вариантов осуществления такие субъекты могут получать комбинированные препараты, которые предусматривают первую композицию, содержащую по меньшей мере один ингибитор TGFβ, например, антитело или его антигенсвязывающий участок, описываемый в настоящем документе, в сочетании со второй композицией, содержащей по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, предусмотренное для лечения того же самого или перекрывающегося заболевания или клинического состояния. Как первая, так и вторая композиции могут действовать на одну и ту же клеточную мишень или различные клеточные мишени. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первая и вторая композиции могут лечить или облегчать одну и ту же или перекрывающуюся группу симптомов или аспектов заболевания или клинического состояния. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первая и вторая композиции могут лечить или облегчать отдельную группу симптомов или аспектов заболевания или клинического состояния. Например, первая композиция может лечить заболевание или состояние, ассоциированное с передачей сигнала с участием TGFβ, в то время как вторая композиция может лечить воспаление или фиброз, ассоциированные с тем же самым заболеванием и т.д. Такие комбинированные препараты можно вводить в сочетании друг с другом. Фраза "в сочетании с" в контексте комбинированных препаратов означает, что терапевтические эффекты первого препарата перекрываются во времени и/или в пространстве с терапевтическими эффектами второго препарата у субъекта, получающего комбинированный препарат. Таким образом, комбинированные препа-

раты можно разрабатывать в виде одной лекарственной формы для совместного введения или в виде отдельных составов для последовательного введения препаратов.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления комбинированные препараты приводят к синергическим эффектам при лечении заболевания. Термин "синергический" относится к эффектам, которые являются большими, чем дополнительные эффекты (например, более высокая эффективность) каждого монотерапии в совокупности.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комбинированные препараты, описываемые в настоящем документе, приводят к эффективности, которая в целом эквивалента таковой, образующейся в результате действия другого препарата (такого как монотерапия вторым средством), однако ассоциированы с меньшим нежелательным побочным эффектом или менее выраженной токсичностью, ассоциированной со вторым средством по сравнению с монотерапией вторым средством. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие комбинированные препараты способствуют меньшей дозе второго средства, однако поддерживают общую эффективность. Такие комбинированные препараты могут быть особенно подходящими для популяций пациентов, в которых требуется длительное лечение, и/или включающих пациентов детского возраста.

Соответственно настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции и способы для применения в комбинированных препаратах для снижения активации белка TGFβ1 и лечения или предупреждения заболеваний или состояний, ассоциированных с передачей сигнала с участием TGFβ1, как описано в настоящем документе. Соответственно способы или фармацевтические композиции дополнительно предусматривают второй препарат. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления второй препарат может быть применимым для лечения или предупреждения заболеваний или состояний, ассоциированных с передачей сигнала с участием TGFβ1. Второй препарат может нормализовать или лечить по меньшей мере один симптом, ассоциированный с целевым заболеванием. Первый и второй препараты могут оказывать свои биологические эффекты в результате аналогичных или несвязанных механизмов действия; или как один, так и оба из первого и второго препаратов могут оказывать свои биологические эффекты в результате множества механизмов действия.

Следует понимать, что фармацевтические композиции, описываемые в настоящем документе, могут иметь первый и второй препараты в том же самом фармацевтически приемлемом носителе или в разном фармацевтически приемлемом носителе для каждого описываемого варианта осуществления. Также следует понимать, что первый и второй препараты можно вводить одновременно или последовательно в соответствии с описываемыми вариантами осуществления.

Одно или несколько антител к TGFβ или их антигенсвязывающих участков по настоящему изобретению можно применять в комбинации с одним или несколькими из дополнительных терапевтических средств. Примеры дополнительных терапевтических средств, которые можно применять с антителом к TGFβ по настоящему изобретению, включают в себя без ограничения ингибитор миостатина, агонист VEGF, агонист IGF1, агонист FXR, ингибитор CCR2, ингибитор CCR5, двойной ингибитор CCR2/CCR5, лизилоксидаза-подобный 2 ингибитор, ингибитор ASK1, ингибитор ацетил-CoA-карбоксилазы (ACC), ингибитор p38-киназы, пирфенидон, нинтеданиб, ингибитор GDF11 или любую их комбинацию.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор контрольных точек. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное средство выбирают из группы, состоящей из антагониста PD-1, антагониста PDL1, слитого белка PD-L1 или PDL2, антагониста CTLA4, агониста GITR, антитела к ICOS, антитела к ICOSL, антитела к B7H3, антитела к B7H4, антитела к TIM3, антитела к LAG3, антитела к OX40, антитела к CD27, антитела к CD70, антитела к CD47, антитела к 41BB, антитела к PD-1, онколитического вируса и ингибитора PARP. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительная терапия представляет собой лучевую терапию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное средство представляет собой химиотерапевтическое средство. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химиотерапевтическим средством является таксол. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное средство представляет собой противовоспалительное средство. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное средство ингибирует процесс рекрутинга моноцитов/макрофагов и/или инфильтрацию тканей. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор активации звездчатых клеток печени. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное средство представляет собой антагонист хемокинового рецептора, например, антагонисты CCR2 и антагонисты CCR5. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такой антагонист хемокинового рецептора является антагонистом с двойной специфичностью, таким как антагонист CCR2/CCR5. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное средство, подлежащее введению в виде комбинированного препарата, является членом суперсемейства TGFβ факторов роста или их регуляторов или содержит его. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое средство выбирают из модуляторов (например, ингибиторов и активаторов) GDF8/миостатина и GDF11. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое средство представляет собой ингибитор передачи сигнала с уча-

стием GDF8/миостатина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое средство представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывает про/латентный комплекс миостатина и блокирует активацию миостатина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления моноклональное антитело, которое специфически связывает про/латентный комплекс миостатина и блокирует активацию миостатина, не связывает свободный зрелый миостатин.

В таких комбинированных препаратах могут предпочтительно использовать меньшие дозы вводимых терапевтических средств, таким образом, предупреждаются возможная токсичность или осложнения, ассоциированные с различными монопрепаратами.

Модулирование активности TGFβ.

Способы по настоящему раскрытию предусматривают модулирование активности фактора роста в одной или нескольких биологических системах. Такие способы могут предусматривать приведение в контакт одной или нескольких биологических систем с антителом и/или композицией по настоящему раскрытию. В некоторых случаях такие способы предусматривают модификацию уровня свободного фактора роста в биологической системе (например, в клеточной нише или у субъекта). Антитела и/или композиции в соответствии с такими способами могут предусматривать без ограничения биологические молекулы, в том числе без ограничения рекомбинантные белки, белковые комплексы и/или антитела или их антигенсвязывающие участки, описываемые в настоящем документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления для снижения или устранения активности фактора роста можно применять способы по настоящему раскрытию, обозначаемые в настоящем документе "способы ингибирования". Некоторые такие способы могут предусматривать удержание зрелого фактора роста в комплексе TGFβ (например, TGFβ1, образующем комплекс с GARP, LTBP1, LTBP3 и/или LRRC33) и/или активацию реассоциации фактора роста в комплексе TGFβ. В некоторых случаях способы ингибирования могут предусматривать применение антитела, которое специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1. В соответствии с некоторыми способами ингибирования предусмотрено одно или несколько ингибирующих антител.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления для ингибирования активации TGFβ1 можно применять антитела, их антигенсвязывающие участки и композиции по настоящему раскрытию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предусмотрен способ ингибирования активации TGFβ1, предусматривающий воздействие на комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1 антитела, его антигенсвязывающего участка или фармацевтической композиции, описываемых в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело, его антигенсвязывающий участок или фармацевтическая композиция ингибирует высвобождение зрелого TGFβ1 из комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и/или комплекса LRRC33-TGFβ1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ осуществляют in vitro. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ осуществляют in vivo. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ осуществляют ex vivo.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 или комплекс LRRC33-TGFβ1 присутствует на внешней поверхности клетки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка представляет собой Т-клетку, фибробласт, макрофаг, моноцит или микроглию.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплекс LRRC33-TGFβ1 присутствует на внешней поверхности профиброзных (М2-подобных) макрофагов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления профиброзные (М2-подобные) макрофаги присутствуют в фиброзном микроокружении. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целенаправленное воздействие комплекса LRRC33-TGFβ1 на внешнюю поверхность профиброзных (М2-подобных) макрофагов предусматривает лучший эффект по сравнению с целенаправленно воздействующими по отдельности комплексами LTBP1-TGFβ1 и/или LTBP1-TGFβ1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1 связан с внеклеточным матриксом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления внеклеточный матрикс содержит фибриллин. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления внеклеточный матрикс содержит белок, содержащий мотив RGD.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящем документе предусмотрен способ снижения активации белка TGFβ1 у субъекта, предусматривающий введение антитела, его антигенсвязывающего участка или фармацевтической композиции, описываемой в настоящем документе, субъекту, тем самым снижается активация белка TGFβ1 у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления у субъекта имеется фиброз или он подвержен риску наличия его. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления у субъекта имеется злокачественная опухоль или он подвержен

риску наличия ее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления у субъекта имеется деменция или он подвержен риску наличия ее.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие участки, как описано в настоящем документе, снижают супрессорную активность регуляторных Т-клеток (Treg).

Наборы для применения при нормализации заболеваний/нарушений, ассоциированных с TGFβ-ассоциированным показанием.

Настоящее раскрытие также предусматривает наборы для применения при нормализации заболеваний/нарушений, ассоциированных с TGFβ-ассоциированным показанием. Такие наборы могут включать один или несколько контейнеров, содержащих антитело или его антигенсвязывающий участок, который специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, например, любой из таковых, описываемых в настоящем документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления набор может содержать инструкции для применения в соответствии с любым из способов, описываемым в настоящем документе. Прилагаемые инструкции могут содержать описание введения антитела или его антигенсвязывающего участка, который специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1 с лечением, замедлением начала наступления или ослаблением целевого заболевания, как таковые, описываемые в настоящем документе. Набор может дополнительно содержать описание выбора индивидуума, подходящего для лечения на основе выявления того, имеет ли данный индивидуум целевое заболевание. В соответствии с еще одними вариантами осуществления инструкции содержат описание введения антитела или его антигенсвязывающего участка индивидууму, подверженному риску целевого заболевания.

Инструкции, относящиеся к применению антител или их антигенсвязывающих участков, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, как правило, включают информацию касательно дозы, схемы дозирования и способа введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут содержать стандартные дозы, нерасфасованные упаковки (например, многодозовые упаковки) или субъединичные дозы. Инструкции, поставляемые в наборах по настоящему раскрытию, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или листке-вкладыше (например, лист бумаги, вложенный в набор), однако также приемлемы машиночитаемые инструкции (например, инструкции, выполненные на магнитном или оптическом диске запоминающего устройства).

Этикетка или листок-вкладыш указывает, что композиция применяется для лечения, задержки наступления начала и/или облегчения заболевания или нарушения, ассоциированного с TGFβ-ассоциированным показанием. Могут быть предусмотрены инструкции для практического осуществления любого из способов, описываемых в настоящем документе.

Наборы по настоящему раскрытию находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает без ограничения флаконы, бутыли, банки, гибкую упаковку (например, закупоренные пакеты из майлара или пластиковые пакеты) и т.п. Также предусмотрены упаковки для применения в комбинации с конкретным изделием, таким как ингалятор, устройство для назального применения (например, атомизатор) или инфузионное устройство, такое как мининасос. Набор может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может содержать мешок с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, прокалываемую подкожной инъекционной иглой). Контейнер может также иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может содержать мешок с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, прокалываемую подкожной инъекционной иглой). По меньшей мере одно активное средство в композиции представляет собой антитело или его антигенсвязывающий участок, который специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, как таковые, описываемые в настоящем документе.

Наборы могут необязательно предусматривать дополнительные компоненты, такие как буферы и интерпретирующая информация. Обычно набор содержит контейнер и этикетку или листок-вкладыш (листки-вкладыши) на контейнере или вместе с контейнером. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие предусматривает содержимое наборов, описываемых в настоящем документе.

Анализы для детекции комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и/или комплекса LRRC33-TGFβ1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способы и композиции, предусматриваемые в настоящем документе, относятся к детекции комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и/или комплекса LRRC33-TGFβ1 в образце, получаемом от субъекта. Используемый в настоящем документе термин "субъект" относится к отдельному организму, например, отдельному млекопитающему. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является человек. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является отличное от человека млекопитающее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является отличный от

человека примат. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является грызун. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является овца, коза, крупный рогатый скот, домашняя птица, кошка или собака. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является позвоночное, амфибия, рептилия, рыба, насекомое или двукрылое. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является животное, используемое для научных исследований. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект является генетически сконструированным, например, генетически сконструированным отличным от человека субъектом. Субъект может быть любого пола и находиться на любой стадии развития. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является пациент или здоровый доброволец.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ детекции комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и/или комплекса LRRC33-TGFβ1 в образце, получаемом от субъекта, предусматривает (a) приведение образца в контакт с антителом, которое специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1 в условиях, подходящих для связывания антитела с антигеном в случае, если антиген присутствует в образце, при этом образуются связывающие комплексы; и (b) определение уровня антитела, связанного с антигеном (например, определение уровня связывающих комплексов).

В соответствии с одним вариантом осуществления предусмотрен скрининговый анализ, в котором используются комплексы латентного TGFβ1, иммобилизированные на поверхности, которые способствует активации латентного TGFβ интегринами в результате связывания. Другие отличные от интегрина активаторы можно также исследовать в этой системе. Считывание можно выполнять при помощи репортерных клеток или других TGFβ-зависимых клеточных ответов.

Клеточные анализы для изменения активации TGFβ.

Активацию TGFβ (и его ингибирование исследуемым ингибитором TGFβ, таким как антитело) можно измерить при помощи любого подходящего способа, известного в данной области. Например, опосредованную интегрином активацию TGFβ можно использовать в клеточном анализе, таком как люциферазный анализ "CAGA12", описываемый более подробно в настоящем документе. Иллюстративный вариант осуществления такого анализа представлен на фиг. 11C в иллюстративных целях. Как видно, такая аналитическая система содержит следующие компоненты: i) источник TGFβ (рекомбинантный, эндогенный или трансфицированный); ii) источник интегрина (рекомбинантный, эндогенный или трансфицированный); и iii) репортерную систему, которая отвечает на активацию TGFβ, такую как клетки, экспрессирующие рецепторы TGFβ, способные отвечать на TGFβ и транслирующие сигнал в считываемые результат (например, люциферазную активность в клетках CAGA12 или других репортерных клеточных линиях). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления репортерная клеточная линия содержит репортерный ген (например, ген люциферазы) под контролем TGFβ-восприимчивого промотора (например, промотора PAI-1). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в репортерную систему можно включать определенные промоторные элементы, которые придают восприимчивость. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления таким промоторным элементом является элемент CAGA12. Репортерные клеточные линии, которые можно использовать в анализе, были описаны, например, в Abe et al. (1994) Anal Biochem. 216(2): 276-84, включенной в настоящий документ посредством ссылки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждый из вышеупомянутых аналитических компонентов получают из одного и того же источника (например, одной и той же клетки). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления два из вышеупомянутых аналитических компонента получают из одного и того же источника, и третий аналитический компонент получают из другого источника. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления все три аналитических компонента получают из различных источников. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления интегрин и комплекс латентного TGFβ (proTGFβ и представляющая молекула) получают для анализа из одного и того же источника (например, одной и той же трансфицированной клеточной линии). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления интегрин и TGF получают для анализа из отдельных источников (например, двух различных клеточных линий, комбинации очищенного интегрина и трансфицированной клетки). В случае, если клетки применяются в качестве источника одного или нескольких аналитических компонентов, такие компоненты анализа могут быть эндогенными по отношению к клетке, стабильно экспрессируемыми в клетке, временно трансфицированными или любой их комбинацией. Результаты на основе неограничивающего иллюстративного варианта осуществления клеточного анализа для измерения активации TGFβ, показывающие ингибирование либо комплекса GARP-proTGFβ1, либо комплекса LRRC33-proTGFβ1 при помощи антител Ab1 и Ab2, раскрываемых в настоящем документе, представлены на фиг. 22A и фиг. 22B соответственно. В этом иллюстративном анализе IC_{50} (мкг/мл) Ab1 в случае комплекса GARP-TGFβ1 составляла 0,445, а IC_{50} (мкг/мл) Ab1 в случае комплекса LRRC33-TGFβ1 составляла 1,325.

Специалист в данной области легко адаптирует такие анализы к различным подходящим конфигурациям. Например, можно рассматривать ряд источников TGFβ. В соответствии с некоторыми вариантами-

ми осуществления источником TGFβ является клетка, которая экспрессирует и откладывает TGFβ (например, первичная клетка, делящаяся клетка, иммортализованная клетка или клеточная линия и т.д.). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления источником TGFβ является очищенный и/или рекомбинантный TGFβ, иммобилизованный в аналитической системе при помощи подходящих средств. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммобилизованный TGFβ в аналитической системе представлен в композиции внеклеточного матрикса (ECM) на аналитическом планшете, с децеллюляризацией или без таковой, которая имитирует происходящий из фибробластов TGFβ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления TGFβ присутствует на клеточной поверхности клетки, используемый в анализе. Кроме того, предпочтительная представляющая молекула может быть включена в аналитическую систему для обеспечения подходящего комплекса латентного TGFβ. Специалист в данной области легко определит, какая(какие) представляющая(представляющие) молекула(молекулы) может(могут) присутствовать или экспрессироваться в определенных клетках или типах клеток. При помощи таких аналитических систем можно легко измерить относительные изменения активации TGFβ в присутствии или отсутствии исследуемого средства (такого как антитела) в целях оценки эффектов исследуемого средства на активацию TGFβ in vitro. Данные на основе иллюстративных клеточных анализов представлены в разделе Примеры ниже.

Такие клеточные анализы можно модифицировать или оптимизировать множеством способов, в зависимости от изформы TGFβ, подлежащей изучению, типа латентного комплекса (например, представляющей молекулы) и т.п. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка, которая, как известно, экспрессирует интегрин, способный активировать TGFβ, может быть использована в анализе в качестве источника интегрина. Такие клетки включают в себя клетки SW480/β6 (например, клон 1E7). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления экспрессирующие интегрин клетки можно котрансфицировать плазмидой, кодирующей представляющую молекулу, представляющую интерес (такую как GARP, LRRC33, LTBP (например, LTBP1 или LTBP3) и др.), и плазмидой, кодирующей проформу изоформы TGFβ, представляющей интерес (такой как proTGFβ1). После трансфекции клетки инкубируют в течение достаточного времени для обеспечения экспрессии трансфицированных генов (например, приблизительно 24 ч), клетки промывают и инкубируют с исследуемым средством (например, антителом) при серийных разведениях. Затем репортерную клеточную линию (например, клетки CAGA12) добавляют к аналитической системе, оставляя в течение подходящего времени инкубации в целях обеспечения передачи сигнала с участием TGFβ. После периода инкубации (например, приблизительно 18-20 ч) после добавления исследуемого средства, сигнал/считывание (например, люциферазную активность) детектируют при помощи подходящих средств (например, для экспрессирующих люциферазу репортерных клеточных линий можно использовать реагент Bright-Glo (Promega)). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления флуоресценцию люциферазу можно детектировать при помощи планшетридера BioTek (Synergy H1), с настройками автоматического контроля усиления.

Нуклеиновые кислоты.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела, их антигенсвязывающие участки и/или композиции по настоящему раскрытию можно кодировать молекулами нуклеиновых кислот. Такие молекулы нуклеиновых кислоты включают без ограничения молекулы ДНК, молекулы РНК, полинуклеотиды, олигонуклеотиды, молекулы мРНК, векторы, плазмиды и т.п. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие может предусматривать клетки, программируемые или генерируемые для экспрессии молекул нуклеиновых кислот, кодирующих соединения и/или композиции по настоящему раскрытию. В некоторых случаях нуклеиновые кислоты по настоящему раскрытию включают в себя кодон-оптимизированные нуклеиновые кислоты. Способы получения кодон-оптимизированных нуклеиновых кислот известны в данной области и могут включать в себя без ограничения таковые, описанные в патентах США № 5786464 и 6114148, содержание каждого из которых включено посредством ссылки во всей своей полноте.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые ни коим образом не носят ограничивающего характера. Полное содержание всех источников литературы, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых в настоящей заявке, а также фигуры включены в настоящий документ посредством ссылки.

Примеры

Пример 1. Ингибирование TGFβ1.

Суперсемейство TGFβ включает в себя пропептиды, образующие комплексы с активными факторами роста (фиг. 1). Разрабатывали стратегии выбора для получения антител, которые стабилизируют комплекс, приводящий к более селективному и эффективному ингибированию.

При помощи системы экспрессии на основе HEK293 выполняли аффинную очистку MNTA и гельфильтрацию с получением мультимиллиграммных количеств очищенного белка, который использовали для получения TGFβ1, образующего комплекс с LTBP (комплекс LTBP-TGFβ1), и TGFβ1, образующего комплекс с GARP (комплекс GARP-TGFβ1) (фиг. 3). Разнообразие получаемых белков способствовало

исследованию видовой перекрестной реактивности и картированию эпитопов. Изображена очистка комплекса sGARP-proTGFβ (фиг. 4A и 4B), комплекса sGARP-TGFβ LAP (фиг. 5) и комплекса LTBP1-proTGFβ1 (фиг. 6).

Кандидатные антитела исследовали при помощи люминесцентных анализов in vitro (фиг. 8). При скрининге антитела, которые ингибировали высвобождение факторов роста, "выключали" репортерные клетки при встрече с раздражителем, предназначенным для нормальной активации. Показали, что Ab1 и Ab2 являлись ингибиторами активации комплексов латентного TGFβ1 (фиг. 7) и были перекрестно-реактивными по отношению к мыши.

Кривые анализа "исходная доза-эффект" Ab1 в клетках, экспрессирующих TGFβ1 человека, показали ингибирование активности TGFβ1 (фиг. 8). При помощи более чувствительной клеточной линии CAGA12 Ab1 характеризовалось аналогичным ингибированием активности proTGFβ1 человека (фиг. 9). Кроме того, показали, что ингибирование комплекса GARP блокировало супрессорную активность регуляторных Т-клеток (Treg), как измеряли по проценту делящихся эффекторных Т-клеток (Teff) в Т-клетках, выделенных из крови здоровых доноров (фиг. 10).

Аффинность ингибиторов GARP-proTGFβ1 измеряли при помощи анализа Octet на клетках человека с GARP-proTGFβ1, в то время как активность измеряли при помощи репортерных клеток CAGA12, исследуя ингибирование GARP-proTGFβ1 человека. Протокол, применяемый для измерения аффинности антител Ab1 и Ab2 по отношению к комплексам, предусматриваемым в настоящем документе, обобщали в табл. 6. Результаты представлены в табл. 7.

Таблица 6

Протокол выполнения анализа связывания Octet

Материалы: - 96 луночные черные полипропиленовые планшеты; - покрытые стрептавидином кончики для Octet; - 10x буфер для кинетического анализа (разбавленный 1:10 в PBS);
1. Замочите требуемое количество стрептавидиновых кончиков в 1X буфере для кинетического анализа; поместите в устройство для уравновешивания.
2. Загрузите планшет с образцами: - 200 мкл буфера или разведенного антитела в каждую лунку; a. столбик 1 – исходный уровень (буфер); b. столбик 2 – биотинилированный белок (например, sGARP-proTGFβ1 или LTBP1-proTGFβ1); разведенный до 5 мкг/мл; c. столбик 3 - исходный уровень 2 (буфер); d. столбик 4 - ассоциация антитела в случае Ab1; e. столбик 5 - ассоциация антитела в случае Ab2; f. столбик 6 - диссоциация Ab 1 (буфер); g. столбик 7 - диссоциация Ab2 (буфер).
3. Выполните разведения в 96-луночном планшете: a. разведите оба антитела до 50 мкг/мл в 300 мкл 1x буфера в ряду A; b. добавьте 200 мкл буфера к остатку каждого столбика; c. перенесите 100 мкл вниз столбика для получения 3-кратных разведений.
4. Поместите планшет с образцами в устройство рядом с планшетом с кончиками.
5. Настройте компьютерную программу: a. укажите буфер, загрузку, образец (один анализ на исследуемое антитело); b. укажите этапы протокола (исходный уровень, загрузка, ассоциация, диссоциация) для строго установленного времени: • исходный уровень: 60 секунд; • загрузка: 300 секунд; • исходный уровень 2: 60 секунд; • ассоциация: 300 секунд; • диссоциация: 600 секунд;
6. Выполните анализ данных: a. вычтите значение исходного уровня из эталонной лунки; b. выполните нормализацию для пяти последних секунд исходного уровня; c. выровняйте до диссоциации; d. выполните анализ по отношению к ассоциации и диссоциации (модель связывания 1:1, эмпирические кривые); e. определите оптимальные значения R^2; включите концентрации с оптимальными значениями R^2; f. выберите общее выравнивание; g. установите цвета образцов по типа сенсоров; h. выполните анализ; i. сохраните таблицу и выполните экспорт.

Таблица 7

Аффинность и активность ингибиторов GARP-proTGFβ1

Клон	**Аффинность в случае GARP-proTGFβ1 (нМ ± SEM)**	**Ингибирование (IC50) GARP-proTGFβ1 (нМ; 95% CI)**	**Максимальный эффект (% ингибирования)**
Ab1	0,046 ± 0,043	3,4 (2,1-5,4)	75%
Ab2	0,561 ± 0,014	3,9 (1,5-10,3)	50%

Клоны дополнительно подвергали скринингу на предмет селективности связывания (табл. 8) и видовой перекрестной реактивности (табл. 9). Ab1и Ab2 не связывались с TGFβ1, TGFβ2 или TGFβ3, однако связывали комплексы proTGFβ1 и характеризовались видовой перекрестной реактивностью.

Таблица 8

Селективность ингибиторов GARP-proTGFβ1

Клон	**GARP-proTGFβ1**	**LTBP1-proTGFβ1**	**LTBP3-proTGFβ1**
Ab1	+++	+++	+++
Ab2	+++	+++	+++

Таблица 9

Видовая перекрестная реактивность ингибиторов GARP-proTGFβ1

Клон	**huGARP-proTGFβ1**	**muGARP-proTGFβ1**	**cyGARP-proTGFβ1**
Ab1	+++	++	+++
Ab2	+++	+++	+++

+++ K_D < 1 нМ,
++ K_D 1 - 10 нМ,
+ K_D 10 - 100 hM,
связывание отсутствует.

Пример 2. Ab1 и Ab2 специфически связывали комплексы proTGFβ1 из нескольких видов.

Для определения того, способны ли Ab1 и Ab2 специфически связываться с комплексами proTGFβ1 из нескольких видов, анализ связывания Octet выполняли, как описано в табл. 6. Как показано в табл. 10 (ниже), оба антитела (т.е., Ab1 и Ab2) специфически связывались с комплексами LTBP1-proTGFβ1 человека и мыши, комплексами LTBP3-proTGFβ1 человека и комплексами GARP-proTGFβ1 человека. Однако лишь Ab2 специфически связывалось с комплексами LTBP1-proTGFβ1 крысы.

Таблица 10

Аффинность Ab1 и Ab2 по отношению к комплексам proTGFβ1 от нескольких видов

	Ab1 (K_D)	Ab2 (K_D)
LTBP1-proTGFβ1 человека	16 ± 1,3	5,8 ± 0,6
LTBP3-proTGFβ1 человека	85 ± 5,0	122 ± 3,9
LTBP1-proTGFβ1 мыши	203 ± 13	61 ± 4,0
LTBP1-proTGFβ1 крысы	Связывание не выявлено	38 ± 6,8
GARP-proTGFβ1 человека	293 ± 22	58 ± 6,2

Пример 3. Ab1 и Ab2 ингибировали эндогенный TGFβ1 в фибробластах человека и мыши. Для определения того, способны ли Ab1 и Ab2 ингибировать эндогенный TGF-β1, секретируемый первичными фибробластами различного происхождения, выполняли количественный анализ in vitro, в котором определяли активность секретируемого TGF-β1 по измерению уровней люциферазы, вырабатываемой эпителиальными клетками легких норки, которые стабильно трансфицировали нуклеиновой кислотой, содержащей ген люциферазного репортера, слитый с синтетическим промотором CAGA12, и кокультивировали с фибробластами, обработанными либо Ab1, либо Ab2. Как изображено на фиг. 11A и 11B, как Ab1, так и Ab2 ингибировали эндогенный TGF-β1, секретируемый нормальными фибробластами дермы человека, фибробластами легких C57BL.6J и фибробластами мышц DBA2/J мыши. Различия в максимальном ингибировании, наблюдаемые в случае каждого антитела, были специфическими по отношению к клеточной линии.

Пример 4. Ab2 связывалось с LRRC33-proTGFβ1.

Для определения того, связываются ли Ab1 и Ab2 с proTGFβ1, который образует комплекс с LRRC33, выполняли анализы связывания Octet. Как изображено на фиг. 12A и 12B, как Ab1, так и Ab2 были способны связываться с белковым комплексом LRRC33-proTGFβ1. Однако Ab1 характеризовалось медленной скоростью связывания с белковым комплексом LRRC33-proTGFβ1. Связывание Ab1 и Ab2 с белковым комплексом LRRC33-proTGFβ1 дополнительно подтверждали при помощи ELISA.

Пример 5. Ab1 и Ab2 ингибировали активность как GARP-proTGFβ1, так и LRRC33-proTGFβ1.

Для определения того, ингибируют ли Ab1 и Ab2 активность GARP-proTGF-β1 и/или LRRC33-proTGF-β1, выполняли клеточный анализ in vitro. В этой аналитической системе разработанную клеточную линию злокачественной опухоли толстой кишки человека (клетки SW480/β6), стабильно трансфицированную интегрином β6, котрансфицировали конструкцией для экспрессии proTGF-β1 и конструкцией для экспрессии представляющей молекулы (например, GARP или LRRC33). Для экспрессии представляющих молекул использовали конструкции, кодирующие химерный LRRC33-GARP (SEQ ID NO: 85) или GARP. Трансфицированные клетки инкубировали с обеспеченини достаточной экспрессии и отложения компонентов (интегринов и proTGFβ1, образующих комплексы с соответствующей представляющей молекулой). Активацию TGFβ1 в присутствии или в отсутствии Ab1 или Ab2 определяли при помощи репортерных клеток (клетки CAGA12), экспрессирующих TGFβ, объединенных со своим путем передачи нисходящего сигнала, с измерением ингибиторной активности антитела. Как изображено на фиг. 13A и 13B, Ab1 и Ab2 ингибировали как GARP-proTGF-β1, так и LRRC33-proTGF-β1.

Дополнительный клеточный анализ проводили для выявления ингибирования как комплекса GARP-proTGFβ1, так комплекса LRRC33-proTGFβ1 при помощи антител Ab1 и Ab2. Как изображено на фиг. 22A и фиг. 22B, Ab1 и Ab2 ингибировали как GARP-proTGF-β1, так и LRRC33-proTGF-β1. В этом анализе IC_{50} (мкг/мл) Ab1 в случае комплекса GARP-TGFβ1 составляла 0,445, а IC_{50} (мкг/мл) Ab1 в случае комплекса LRRC33-TGFβ1 составляла 1,325.

Пример 6. Эффекты Ab2 на почечные биомаркеры и фиброз в модели односторонней окклюзии мочеточника (UUO) у мыши.

Модель односторонней окклюзии мочеточника у мыши широко использовали для изучения интерстициального фиброза, распространенного патологического процесса, который приводит к терминальной почечной недостаточности (см. Isaka et al. (2008) Contrib. Nephrol. 159: 109-21, и Chevalier (1999) Pediatr. Nephrol. 13: 612-9). Мыши с UUO характеризовались активацией фибробластов почек, атрофией канальцев и интерстициальным фиброзом с минимальными повреждениями клубочков (см. Lian et al. (2011) Acta Pharmacol. Sin. 32: 1513-21). Считается, что повышенная экспрессия TGFβ1 играет роль в фенотипе, наблюдаемом у мышей с UUO. Для оценки влияния Ab2 на проявление интерстициального фиброза в модели UUO у мыши проводили следующий эксперимент.

Вкратце, самцов мышей CD-1 в возрасте 7-8 недель (Charles River Laboratories) разделяли на 4 группы (n=10) и вводили Ab2 (3 мг/кг или 30 мг/кг; объем дозирования 10 мл/кг), контрольное антитело IgG1 мыши (30 мг/кг; объем дозирования 10 мл/кг) или PBS в качестве контроля носителя интраперитонеально (i.p.) до хирургического вмешательства. Обработки выполняли за один день до операции (d-1), через один день после операции (d1) и через 3 дня после операции (d3). На день 0 (d0), мышей анестезировали изофлурановой анестезией на переднем конусе и выполняли лапаротомию, после чего проводили операцию по поводу правой односторонней UUO. Дополнительной контрольной группе мышей (n=8) вводили PBS, как описано выше, однако подвергали только плацебо-хирургии (т.е., лапаротомии без окклюзии мочеточника). Непосредственно после завершения хирургической процедуры все мыши получали одну подкожную инъекцию бупренофрина в дозе 0,001 мг/кг. Мышей выводили из эксперимента через пять дней после операции, а ткани брали для анализа. После получения обе почки помещали в охлажденный на льду раствор 0,9% NaCl, декапсулизировали и взвешивали. Определяли уровни гидроксипролина для оценки содержания коллагена в ткани почки. Как изображено на фиг. 14, уровни гидроксипролина в почках, маркер тканевого фиброза и отложения коллагена, значительно возрастали у мышей, которые переносили хирургическое вмешательство по сравнению с мышами, перенесшими плацебо-операцию.

Серединный поперечный срез каждой правой почки фиксировали погружением в 10% забуференный нейтральный формалин на 48 ч, который затем переносили в 70% этанол для гистологической обработки и анализа. Фиксированные срезы почки погружали в парафин, делали срезы (три 5 мкм серийных среза, захватываемых на расстоянии 200-250 мкм друг от на почку животного для обеспечения более эффективного взятия образца и характеристики повреждения почки), окрашивали пикросириусом красным и подвергали количественному гистологическому анализу при помощи сегменации цветового спектра с определением объемной фракции коллагена (CVF) в корковом веществе. Один композитный балл CVF рассчитывали для каждого животного путем определения среднего балла CVF для каждого из трех серийных срезов. Статистический анализ выполняли с применением непарного критерия Стьюдента. Как изображено на фиг. 16, фиброз коркового вещества почек, как определяли по CVF, возрастал в почках с

обструкцией при UUO по сравнению с нормальными мышами, перенесшими плацебо-операцию. Мыши, получающие либо 3 мг/кг, либо 30 мг/кг Ab2, характеризовались значительным ослаблением UUO-индуцированного повышения CVF по сравнению с мышами, получающими либо контроль носителем (PBS), либо контроль IgG.

Определяли относительные уровни экспрессии мРНК ингибитора-1 активатора плазминогена (PAI-1), фактора роста соединительной ткани (CTGF), TGFβ1, фибронектина-1, α-гладкомышечного актина (α-SMA), моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1), альфа 1 цепи коллагена I типа (Col1a1) и альфа 1 цепи коллагена III типа коллагена (Col3a1) в собранной ткани почек (фиг. 15A-15H). Уровни мРНК нормализовали с применением уровней мРНК гена домашнего хозяйства гипоксантинфосфорибозилтрансферазы 1 (HPRT1). Помимо этого, у мышей, получавших Ab2 в дозе либо 3 мг/кг, либо 30 мг/кг до хирургического вмешательства, уровни мРНК PAI-1, CTGF, TGFβ1, фибронектина 1, Col1a1 и Col3a1 значительно снижались по сравнению с мышами, получавшими контроль IgG1 в дозе 30 мг/кг У мышей, получавших Ab2 в дозе 3 мг/кг до хирургического вмешательства, уровни мРПК α-SMA значительно снижались по сравнению с мышами, получавшими контроль IgG1 в дозе 30 мг/кг. Также у мышей, получавших Ab2 в дозе 30 мг/кг до хирургического вмешательства, уровни мРПК MCP-1 значительно снижались по сравнению с мышами, получавшими контроль IgG1 в дозе 30 мг/кг.

В заключение следует отметить, что значительные эффекты наблюдали у мышей, обработанных Ab2, в модели UUO у мыши, за исключением уровней гидроксипролина. Как изображено на фиг. 15A-15H и 16, обработка Ab2 значительно ослабляла UUO-индуцированное повышение CVF и значительно снижала экспрессию генов известных маркеров фиброза, таких как PAI-1, CTGF, TGFβ1, фибронектин 1, Col1a1 и Col3a1. Эти данные показали, что TGFβ1 являлся основной формой TGFβ, играющего роль в болезни почек, и, что оказалось неожиданным, TGFβ2 и TGFβ3, по-видимому, не были вовлечены в патогенез.

Пример 7. Эффекты Ab1 и Ab2 в отдельности или в комбинации с антителом к PD-1 на прогрессирование опухоли в сингенной модели карциномы толстой кишки MC38 мышей.

Для оценки эффектов Ab1 и Ab2 в отдельности или в комбинации с антителом к PD-1 для снижения прогрессирования опухоли при карциноме толстой кишки использовали сигенную модель карциномы толстой кишки MC38 мышей C57BL/6.

Культивирование опухолевых клеток.

Клетки карциномы толстой кишки MC38 мыши выращивали в модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM), содержащей 10% фетальную бычью сыворотку, 100 единиц/мл пенициллина G натриевой соли, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата, 25 мкг/мл гентамицина и 2 мМ глутамина. Клеточные культуры поддерживали во флаконах для клеточных культур в увлажненном инкубаторе при 37 °C, в атмосфере 5% CO_2 и 95% воздуха.

Имплантация in vivo и опухолевый рост.

Клетки MC38, используемые для имплантации, собирали во время log-фазы роста и ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). В день имплантации опухоли каждому испытуемому животному вводили подкожно в правый бок 5×10^5 клеток (0,1 мл клеточной суспензии), и опухолевый рост отслеживали в виде среднего размера, достигающего целевого диапазона от 80 до 120 мм^3. Через одиннадцать дней, с обозначением как 1-й день исследования, мышей распределяли в соответствии с рассчитанными размером опухоли на группы, при этом каждая из которых состояла из двенадцати животных с индивидуальными объемами опухолей, варьирующими от 63 до 196 мм^3 и групповыми средними объемами опухолей от 95 до 98 мм^3. Опухоли измеряли в двух измерениях при помощи штангенциркулей и объем рассчитывали при помощи формулы:

$$\textbf{Размер опухоли (мм}^3\textbf{)} = \frac{w^2 \times l}{2},$$

где w=ширина и l=длина опухоли в мм.

Массу опухоли оценивали, исходя из предположения, что 1 мг эквивалентен 1 мм^3 объема опухоли.

Обработка.

Вкратце, самкам мышей C57BL/6 в возрасте восьми недель (n=12), несущим подкожные опухоли MC38 (63-172 мм^3), в 1-й день вводили интраперитонеально (i.p.) два раза в неделю в течение четырех недель Ab1, Ab2, контрольное антитело IgG1 мыши (каждое в дозе 30 мг/кг в объеме дозирования 10 мл/кг). Когда опухоли в контрольной группе достигали 150 мм^3 (6-й день), мышам вводили либо крысиное антитело к PD-1 мыши (RMP1-14), либо крысиное контрольное антитело IgG2A i.p. два раза в неделю в течение двух недель (каждое антитело в дозе 5 мг/кг в объеме дозирования 10 мл/кг).

Группа 1 выступала в качестве контроля опухолевого роста и получала мышиное антитело изотипического контроля IgG1 в комбинации с крысиным контрольным антителом IgG2a. Группа 2 получала Ab1 в комбинации с крысиным контрольным антителом IgG2a. Группа 3 получала Ab2 в комбинации с крысиным контрольным антителом IgG2a. Группа 3 получала мышиное контрольное антитело IgG1 в комбинации с антителом к PD-1. Группа 4 получала Ab1 в комбинации с антителом к PD-1. Группа 5 по-

лучала Ab2 в комбинации с антителом к PD-1. Группу 6 (n=16) не обрабатывали и она выступала в качестве группы выборочного контроля.

Анализ конечных точек и задержки опухолевого роста (TGD).

Опухоли измеряли при помощи штангенциркулей два раза в неделю и каждое животное выводили из эксперимента, когда его опухоль достигала объема конечной точки 1000 мм^3 или в конце исследования (60-й день), в зависимости от того, что происходило раньше. Мышей, которые покидали исследование в связи с конечной точкой объема опухоли, характеризовали как выведенных из эксперимента в результате прогрессирования опухоли (TP), с указанием даты выведения из эксперимента. Время до конечной точки (TTE) анализа рассчитывали для каждой мыши при помощи следующего уравнения:

$$\mathbf{TTE} = \frac{\mathbf{log10(объем\ конечной\ точки) - b}}{\mathbf{M}},$$

где TTE выражается в днях, объем конечной точки выражается в мм^3,

b - отсекаемый отрезок, а

m - угол наклона линии, получаемый в результате линейной регрессии логарифмически преобразованной совокупности данных по опухолевому росту.

Совокупность данных состояла из первого наблюдения, которое превышало объем конечной точки, используемый в анализе, и трех последовательных наблюдений, которые непосредственно предшествовали достижению этого объема конечной точки. Рассчитанное TTE обычно было меньше даты TP, дня, когда животное выводили из эксперимента в связи с размером опухоли. Мышам с опухолями, которые не достигали объема конечной точки, присваивали значение TTE, равное последнему дню исследования (60-й день). В случаях, когда логарифмически преобразованное рассчитанное TTE предшествовало дню до достижения конечной точки или превышало день достижения объема опухоли конечной точки, в целях аппроксимации TTE выполняли линейную регрессию. Мышей, которые погибли от не связанных с лечением (NTR) причин, исключали из расчетов TTE (и всех последующих анализов). Животным, классифицированным как TR (гибель связана с лечением) и NTRm (не связанная с лечением гибель в результате метастазирования), присваивали значение TTE, равное дню гибели.

Результат обработки оценивали, исходя из задержки опухолевого роста (TGD), определяемой в виде повышения медианного времени до конечной точки (TTE) в группе обработки по сравнению с контрольной группой:

$$\mathbf{TGD = T - C,}$$

выражаемого в днях или в виде процента медианного TTE контрольной группы:

$$\mathbf{\%TGD} = \frac{\mathbf{T - C}}{\mathbf{C}} \times \mathbf{100},$$

где:

T=медианное TTE для группы обработки и

C=медианное TTE для обозначенной контрольной группы.

MTV и критерии регрессионных ответов.

Эффективность обработки можно было определить на основе объемов опухоли животных, оставшихся в исследовании в последний день. MTV (n) определяли как медианный объем опухоли в последний день исследования у числа оставшихся животных (n), опухоли которых не достигали объема конечной точки.

Эффективность обработки также можно было определять на основе частоты и величины регрессионных ответов, наблюдаемых во время исследования. Обработка может вызывать частичную регрессию (PR) или полную регрессию (CR) опухоли у животного. При ответе PR объем опухоли составлял 50% или менее от своего объема в 1-й день в случае трех последовательных измерений в течение исследования, и равнялся или был более 13,5 мм^3 в случае одного или нескольких из этих измерений. При ответе CR объем опухоли составлял менее 13,5 мм^3 в случае трех последовательных измерений в течение исследования. Животное с ответом CR при завершении исследования дополнительно классифицировали как выжившее без опухоли (TFS). Животных отслеживали в отношении регрессионных ответов.

Ингибирование опухолевого роста.

В анализе ингибирования опухолевого роста (TGI) оценивали разницу медианных объемов опухоли (MTV) обработанных и контрольных мышей. В случае этого исследования конечной точкой для определения TGI был 29-й день, который представлял собой день, когда контрольные мыши достигали среднего объема опухоли, составляющего 1500 мм^3. MTV (n), медианный объем опухоли, для числа животных, n, в день наступления анализа TGI, определяли для каждой группы. Процент ингибирования опухолевого роста (%TGI) определяли как разницу между MTV обозначенной контрольной группы и MTV обрабатываемой лекарственным средством группы, определяемую в виде процента MTV контрольной группы:

$$\%TGI = \left(\frac{MTV_{контр.} - MTV_{обраб.лек.}}{MTV_{контр.}} \right) \times 100 = [1 - (MTV_{обраб.лек.} / MTV_{контр.})] \times 100$$

Совокупность данных для анализа TGI включала в себя всех мышей в группе, за исключением таковых, которые погибли в результате связанных с лечением (TR) или не связанных с лечением (NTR) причин до наступления дня анализа TGI.

В настоящем исследовании Ab1 и Ab2 оценивали в отдельности и в комбинации с антителом к PD-1 в сингенной модели карциномы толстой кишки MC38 у мышей C57BL/6. Мыши, которым вводили Ab2 в комбинации с антителом к PD-1, характеризовались значительным TGI в 29-й день ($P<0,05$, U-критерий Манна-Уитни), что приводило к преимуществу в выживаемости, которое значимо отличалось от обработанных носителем контролей, при применении логрангового анализа выживаемости ($P<0,05$, логранговый критерий) (см. фиг. 17). Мыши, получавшие Ab1 или Ab2 в комбинации с крысиным контрольным антителом IgG2a, характеризовались регрессионными ответами 1 CR и 1 PR соответственно. В комбинации с антителом к PD регрессионные ответы Ab1 и Ab2 составляли 1 PR и 1 CR, а также 4 CR соответственно. Ab2 в комбинации с антителом к PD-1 приводило к значительной кратковременной эффективности в 29-й день и приводило к общему преимуществу в выживаемости в данном 60-дневном исследовании TGD в сингенной модели карциномы толстой кишки MC38 у мышей C57BL/6.

Пример 8. Роль TGFβ1 в мышечной дистрофии.

TGFβ выполняет многочисленные функции в функционировании скелетных мышц, в том числе ингибирование миогенеза, регуляция воспаления и мышечной репарации, а также активация фиброза. Несмотря на то, что существует значительный интерес в ингибировании TGFβ в качестве терапии разнообразных заболеваний, в том числе мышечных дистрофий, эти виды лечения ингибируют TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3 вне зависимости от молекулярного контекста. Отсутствие специфичности/селективности этих ингибиторов может приводить к нежелательным побочных эффектам, приводящим к клиническим дозам с незначительной эффективностью. Несмотря на то, что сообщалось, что ингибиторные молекулы pan-TGFβ улучшают мышечную функцию и уменьшают фиброз у мыши с наличием mdx, происходили ли эти эффекты в результате инактивации TGFβ1, β2 или β3 еще предстоит рассмотреть.

С этой целью создавали антитела, которые специфически блокируют опосредованную интегрином активацию латентного TGFβ1, при этом не воздействуя на TGFβ2 и β3. Мышей с наличием D2.mdx обрабатывали специфическими антителами к proTGFβ1 с тем, чтобы определить роль TGFβ1 конкретно в репарации мышечной ткани в дистрофических мышцах. Определяли функциональное влияние ингибирования TGFβ1 на защиту от повреждения, вызванного сокращением, а также на восстановление в результате повреждения тем же самым способом. Гистологическая оценка включала, влияет ли обработка на повреждение, фиброз и воспаление мышечной ткани. Кроме того, можно было оценить возможную токсичность для определения того, связаны ли наблюдаемые отрицательные эффекты, отмечаемые в случае ингибирования pan-TGFβ в мышечной ткани (например, повышенное воспаление, продолжительная недостаточность мышечной функции) с ингибированием TGFβ1 или TGFβ2/3. Для понимания того, является ли ингибирование TGFβ1 в специфических молекулярных контекстах более эффективным и/или оказывает ли оно менее отрицательные эффекты (побочные эффекты), эффективность ингибиторов LTBP-proTGFβ1 в этой модели можно было определять в целях обращения роли иммунной клетки, представляющей TGFβ1, от таковой, представленной во внеклеточном матриксе (ECM), потенциально приводя к более безопасным и/или более эффективным противофиброзным видам терапии.

Дистрофическая мышечная ткань является очень восприимчивой к повреждению, вызванному сокращением. После повреждения мышечная ткань от мышей с наличием mdx характеризовалась значительным снижением генерации силы и повышенным захватом красителя эванса синего, указывающего на физическое повреждение/разрушение мышечного волокна по сравнению с WT (Lovering, R.M., et al., Arch Phys Med Rehabil, 2007. 88(5): p. 617-25). Терапевтические средства, которые снижают степень повреждения, вызванного сокращением, или улучшают восстановление после повреждения, имели бы значительную клиническую эффективность для пациентов с мышечной дистрофией (Bushby, K., et al., Lancet Neurol, 2010. 9(1): p. 77-93). Ab1 и Ab2 оценивали в отношении их способности i) предупреждать повреждение, вызванное сокращением, а также ii) способствовать восстановлению вследствие повреждения. Штамм D2.mdx можно было использовать в других наших экспериментах, в отличие от традиционного штамма mdx на основе B10. Такие мыши, полученные в результате скрещивания mdx на основе DBA2/J, имели вариант LTBP4 с отсутствием защиты, описанным в настоящем документе, и, тем самым, проявляли патологическую картину заболевания, которое было более тяжелым, прогрессирующим и аналогичным болезни человека, по сравнению со стандартным штаммом mdx (Coley, W.D., et al., Hum Mol Genet, 2016. 25(1): p. 130-45). Поскольку использовали мышей D2.mdx, то мыши DBA2/J выступали в качестве контроля дикого типа. Поскольку DMD поражает преимущественно мужчин, то исследования можно было сосредоточить на самцах мышей.

Для исследования способности Ab1 и Ab2 предупреждать/ограничивать повреждение, вызванное

сокращением, самцов мышей D2.mdx в возрасте 6 месяцев (n=10) обрабатывали контролем IgG, Ab1 или Ab2 в дозе 10 мг/кг/недель в течение 6 недель. Для обеспечения сравнения с опубликованным исследованием с применением ингибитора pan-TGFβ четвертой группе вводили 1D11 в дозе 10 мг/кг/неделю. Все антитела представляли собой изотип mIgG1 и, как было показано ранее, эта доза была эффективной в модели UUO (фиг. 15 и 16). Также включали группу WT, которой вводили контроль IgG. За 24 ч до выведения из эксперимента, мышам вводили 1% краситель эванс синий (EBD) в PBS (объем 1% от массы тела) в целях обеспечения оценки повреждения мышечных волокон при помощи флуоресцентной микроскопии. В конце обработки по отношению к мышам применяли протокол эксцентрического сокращения in vivo. Эксцентрическое повреждение икроножной мышцы можно было выполнять с применением системы мышечной рычажной системы 305B (Aurora Scientific), как описано (Khairallah, R.J., et al., Sci Signal, 2012. 5(236): p. ra56). Вкратце, выполняли 20 эксцентрических сокращений с перерывами в 1 мин, и снижение пика изометрической силы перед эксцентрической фазой можно быть принимать в качестве показателя повреждения мышечной ткани. Можно было определять степень потери силы и процент EBD-положительных волокон. Мыши DBA2/J, по отношению к которым применяли этот протокол, теряли 30-40% от исходной силы после 20 эксцентрических сокращений. В отличие от этого, мыши D2.mdx теряли 80% от исходной силы после применения по отношению к ним этого же самого протокола, как описывали ранее (Pratt, S.J., et al., Cell Mol Life Sci, 2015. 72(1): p. 153-64; Khairallah, R.J., et al., Sci Signal, 2012. 5(236): p. ra56). Определения способность Ab1 и Ab2 ослаблять потерю силы после повреждения. Мышей выводили из эксперимента в конце эксперимента и для гистологического анализа можно было собирать как поврежденные, так и неповрежденные икроножные мышцы. Захват EBD можно было определять на основе обоих мышц. Можно было измерять площадь поперечного среза мышечных волокон и степень фиброза. Для определения площади поперечного среза срезы из области средней линии живота мышцы можно было окрашивать агглютинином из проростков пшеницы, конъюгированным с флуорофором, с визуализацией клеточных мембран. Срезы можно было преобразовывать в цифровую форму, границы клеток отслеживать при помощи прогностической компьютерной программы и площадь поперечного среза определять путем несмещенных автоматизированных измерений. Для анализа фиброза срезы можно было окрашивать пикросириусом красным (PSR) и вычислять площадь PSR^+ на изображение.

Определяли способность Ab1 и Ab2 ускорять восстановление в результате повреждения, вызванного сокращением. По отношению к мышам DBA2/J и D2.mdx в возрасте 12 недель могли применять тот же самый протокол эксцентрических сокращений, описываемый выше. После повреждения мышей разделяли на группы обработки (n=10) и вводили контроль IgG (для мышей WT и D2.mdx), 1D11, Ab1 или Ab2 (только для D2.mdx). Антитела можно было вводить в дозе 10 мг/кг/неделю в течение эксперимента. На 7-й и 14-й дни после повреждения для оценки эффекта обработки на восстановление от повреждение можно было измерять максимальную пиковую изометрическую силу, соотношение одиночных сокращений к тетаническим и отношение "сила-частота". Несмотря на то, что Ab1 и Ab2 ингибировали высвобождение TGFβ1 вне зависимости от представляющей молекулы, селективное высвобождение TGFβ1 из внеклеточного матрикса (т.е. LTBP-представленное) могло иметь большую эффективность при DMD в результате сохранения TGFβ1-регулируемой активности Treg. Для изучения этого вопроса специфические ингибиторные антитела к LTBP-proTGFβ1 можно также оценивать в отношении как способности предупреждать повреждение, вызванное сокращением, так и способности ускорять восстановление вследствие повреждения.

Пример 9. Роль TGFβ1в регенерации скелетных мышц после острого повреждения.

Можно исследовать роль TGFβ1 конкретно в регенерации мышечных волокон после повреждения. Можно использовать TGFβ1-специфические антитела в модели повреждения кардиотоксинами для определения роли TGFβ1 конкретно во время регенерации мышечных волокон. Регенерацию можно определять гистологически и можно проводить функциональные оценки мышечной силы и качества. Учитывая потенциальные преимущества ингибирования TGFβ1 для регенерации мышечной ткани, препараты, которые оказывают положительные эффекты, не приводя к токсичности, наблюдаемой в случае ингибирования pan-TGFβ, имели бы большое преимущество. Это способствовало изучению эффектов TGFβ1-специфического ингибирования на функционирование клеток-сателлитов и содействовало подробному анализу исследований по трансплантации клеток-сателлитов.

Как описано выше, TGFβ, по-видимому, оказывает многочисленные эффекты на биологию мышечной ткани, включая ингибирование пролиферации и дифференциации миобластов, а также активацию атрофии и фиброза (Allen, R.E. and L.K. Boxhorn, J Cell Physiol, 1987. 133(3): p. 567-72; Brennan, T.J. et al., ProcNatl Acad Sci USA, 1991. 88(9): p. 3822-6; Massague, J. et al., ProcNatl Acad Sci USA, 1986. 83(21): p. 8206-10; Olson, E.N., et al., J Cell Biol, 1986. 103(5): p. 1799-805; Li, Y. et al., Am J Pathol, 2004. 164(3): p. 1007-19; Mendias, C.L., et al., Muscle Nerve, 2012. 45(1): p. 55-9; Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21). Однако в этих исследованиях либо использовали рекомбинантный TGFβ1 в культуре, либо инъецировали его мышам, что могло приводить к нефизиологическим результатам, поскольку фактор роста удаляли из молекулярного контекста. Альтернативно исследователи использовали ингибиторы TGFβ, которые не являлись селективными по отношению к TGFβ1.

Для оценки изоформно-специфических эффектов TGFβ1, можно было исследовать несколько антител к proTGFβ1 (например, Ab1 и Ab2) в отношении их способности влиять на регенерацию мышц после CTX-индуцированного повреждения. Эти антитела являлись "изоформно-специфическими" и "контекстно-пермиссивными" ингибиторами активации TGFβ1 таким образом, что они специфически ингибировали высвобождение TGFβ1 (в отличие от TGFβ2 или TGFβ3) из любой представляющей молекулы и не связывают зрелые факторы роста (фиг. 18A).

Регенерацию мышечной ткани можно было индуцировать у самцов мышей DBA2/J (n=10) в результате инъекции CTX в правую икроножную мышцу. За день до повреждения мышам вводили контроль IgG, 1D11, Ab1 или Ab2 в дозе 10 мг/кг. Антитела продолжали вводить один раз в неделю до завершения исследования. На 7-й и 14-й дни после повреждения можно было выполнять измерения мышечной силы in vivo при помощи мышечной рычажной системы 305C (Aurora Scientific Inc., Орора, Канада). Вкратце, для мышечной группы сгибателей подошвы сокращения вызывали в результате чрескожной электрической стимуляции седалищного нерва у анестезированных мышей, и затем выполняли ряд стимуляций при возрастающей частоте стимуляции (пульс 0,2 мс, продолжительность тренировки 500 мс): 1,10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 Гц, с последующей конечной стимуляцией при 1 Гц. Определяли максимальную пиковую изометрическую силу, соотношение одиночных сокращений к тетаническим и отношение "сила-частота". После силовых измерений поврежденные икроножные и камбаловидные собирали и готовили для гистологического анализа. Площадь поперечного среза мышечных волокон и $\%PSR^{+}$ площадь можно было определять, как описано в примере 8 выше.

Обработка Ab1 и Ab2 могла приводить к снижению фиброза и улучшению мышечной функции. Однако, учитывая роль TGFβ1 в регуляции иммунной активации, возможно, что наблюдали усиленное воспаление в случае антител, как было описано в случае обработки 1D11 (Andreetta, F., et al., J Neuroimmunol, 2006. 175(1-2): p. 77-86). В этом случае усиленное воспаление могло ограничивать терапевтические эффекты ингибирования TGFβ1, затем можно было оценивать контекстно-специфические антитела для обеспечения дополнительной степени специфичности, которая могла ограничивать токсичность. Например, можно было использовать антитела, которые ингибировали высвобождение TGFβ1 только из LTBP с применением считываний и способов, описываемых выше. Эти антитела могли ограничивать высвобождение TGFβ1 только из ECM, не влияя на высвобождение из Treg или макрофагов.

Пример 10. Выбор подходящих ингибиторных средств по отношению к TGFβ1.

Анализ экспрессии proTGFβ1 и его представляющей молекулы в нормальной, регенерирующей и пораженной мышечной ткани мог предоставить полезную информацию для помощи в выборе оптимального терапевтического подхода. Учитывая потенциальные преимущества ингибирования TGFβ1 при регенерации и репарации мышечной ткани, понимание контекста представления proTGFβ1 (например, в ECM или на иммунных клетках) в скелетных мышцах в различных условиях (норма, острое поражение и хроническое поражение) могло способствовать получению информации о терапевтическом применении антител и в конечном итоге способствовать подробному анализу степени специфичности/селективности, требуемой для достижения клинической эффективности и безопасности. Природа представления TGFβ1 могла варьировать в зависимости от состояния здоровья и в зависимости от течения заболевания, что могло оказывать влияние на любые направленные на TGFβ1 виды терапии. Понимание профилей экспрессии этих молекул также способствовала выбору подходящего времени введения потенциальных терапевтических молекул. При помощи вестерн-блоттинга, иммуногистохимического анализа и иммунопреципитации можно было определять экспрессию proTGFβ1 и его представляющих молекул в здоровой, остро поврежденной (повреждение кардиотоксинами) и хронически регенерирующей (мыши D2.mdx) мышечной ткани. Экспрессию этих молекул можно было изучать конкретно в основных типах клеток или подгруппе типов клеток (например, клетках-сателлитах, макрофагах, фиброадипогенных предшественниках и т.п.) в различных условиях, описываемых выше.

Несмотря на то, что изоформы TGFβ изучали в мышцах, взятых от мышей с наличием mdx, предыдущие исследования сосредотачивались на экспрессии зрелых факторов роста (Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21; Zhou, L., et al., Neuromuscul Disord, 2006. 16(1): p. 32-8). Учитывая целевую специфичность антител к TGFβ1, описываемых в настоящем документе, важно, чтобы изучали паттерны экспрессии не только для зрелых и proTGFβ1, но также таковые представляющих молекул, которые бы давали бы информацию касательно источника и/или контекста пула TGFβ1, представляющего интерес. В идеале желательно получать понимание паттернов экспрессии латентных комплексов, а не просто каждого компонента.

Антитела подвергали скринингу с применением вестерн-блоттинга и IHC по отношению к мишеням, представляющим интерес. Антитела к мышиным TGFβ1-LAP, LTBP1, LTBP3 и LTBP4 были коммерчески доступны. Антитело к TGFβ1-LAP (клон TW7-16B4) тщательно описывали и оно характеризовалось эффективностью как в проточной цитометрии, так и в вестерн-блоттинге (Oida, T. and H.L. Weiner, PLoS One, 2010. 5(11): p. e15523). Антитела к LTBP1 (ProteinTech № 22065-1-AP) и LTBP3 (Millipore № ABT316) валидировали внутренним путем при помощи клеток SW480, трансфицированных

LTBP1-proTGFβ1 или LTBP3-proTGFβ1 и они оказалось специфическими по отношению к своим мишеням. Можно было определить применимость этих антител для ШС. Из мышц, взятых от нормальных мышей и мышей с наличием D2.mdx, делали срезы, и антитела исследовали на замороженных срезах и FFPE-срезах. Антитела можно было валидировать с применением условий включения с 100× избытком очищенного целевого белка или комплекса (изготовленного внутренним путем, см. фиг. 18B в качестве примера) в целях обеспечения того, чтобы наблюдаемый сигнал был специфичным.

В предыдущем исследовании идентифицировали антитела, которые специфически связывались с определенных латентным комплексом, но не обладали ингибиторной активностью. Связывание антигенов этими антителами подтверждали при помощи ELISA (фиг. 18B и 18C) и также можно было оценивать применимость в IHC (учитывая пространственную структуру этих эпитопов, такие антитела вряд ли были эффективными в качестве реагентов для вестерн-блоттинга). Присутствие латентных комплексов TGFβ1 из совокупной ткани можно было определять при помощи вестерн-блоттинга или иммунопреципитации. Латентные комплексы можно было идентифицировать при помощи вестерн-блоттинга при анализе одного и того же образца в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. В восстанавливающих условиях TGFβ1, LAP и представляющая молекула разделялись и эти три молекулы можно было идентифицировать на одном и том же блоте, однако при использовании способов двухцветового вестерн-блоттинга. В невосстанавливающих условиях комплекс LAP:представляющая молекула оставался ассоциированным, в то время как TGFβ1 высвобождался; комплекс мигрировал медленнее, чем пустая представляющая молекула и мигрировал совместно с TGFβ1-LAP (фиг. 18B). Различные антитела также оценивали в отношении их способности иммунопреципитировать латентные комплексы из мышечной ткани в целях демонстрации непосредственного связывания TGFβ1 с конкретными представляющими молекулами.

Непосредственно после идентификации подходящих антител определяли экспрессию в нормальной, регенерирующей и дистрофической мышечной ткани при помощи вестерн-блоттинга и/или IHC, в зависимости от доступных антител. Переднюю большеберцовую мышцу (TA) и диафрагмальные мышцы можно было получать от мышей DBA2/J и D2.mdx в возрасте 4, 8 и 12 недель. В случае регенерирующей мышечной ткани кардиотоксин можно было вводить в TA мышам DBA2/J в возрасте 12 недель, и получать мышцы через 3, 7 и 14 дней после повреждения. Ткань от по меньшей мере 4 мышей можно было использовать для каждого условия/временной точки. Эксперименты по совместному окрашиванию можно было проводить для идентификации клеточных популяций, экспрессирующих различные молекулы (например, CD11b в случае макрофагов, FoxP3 в случае Treg, MyoD в случае миогенных клеток).

Пример 11. Ab2 характеризовался сниженной токсичностью по сравнению с ингибитором ALK5-киназы LY2109761 и антителом к pan-TGFβ.

Для оценки токсичности Ab2 по сравнению с низкомолекулярным ингибитором киназы рецептора TGF-β I типа (ALK5) LY2109761 и антитела к pan-TGFβ (hIgG4) выполняли исследования токсичности у крыс. Вкратце, самкам крыс F344/NHsd вводили Ab2 в дозе 3 мг/кг (1 группа, n=5), в дозе 30 мг/кг (1 группа, n=5) или в дозе 100 мг/кг (1 группа, n=5); антитело к pan-TGFβ в дозе 3 мг/кг (1 группа, n=5), в дозе 30 мг/кг (1 групп, n=5) или в дозе 100 мг/кг (1 группа, n=5); LY2109761 в дозе 200 мг/кг (1 группа, n=5) или в дозе 300 мг/кг (1 группа, n=5); или контроль носителем PBS (pH 7,4) (1 группа, n=5). Животные, получавшие Ab2, антитело к pan-TGFβ или контроль носителем, получали однократную дозу внутривенно (в 1-й день), и крысы, получавшие LY2109761, получали однократную дозу ежедневно при помощи перорального зонда в течение 7 дней (7 доз). Массу тела животных определяли через 1, 3 и 7 дней после фазы дозирования. Животных выводили из эксперимента на 8-й день и выполняли вскрытие.

Как показано в данных выживаемости, изображенных на на фиг. 19, Ab2 характеризовалось сниженной токсичностью по сравнению с другми группами обработки. Всем животным, которым вводили ингибитор ALK5-киназы LY2109761 в дозе 300 мг/кг, выводили из эксперимента в агонирующем состоянии или находили мертвыми на 3-й, 6-й или 7-й день исследования. Двое из животных, которым вводили LY2109761 в дозе 200 мг/кг были обнаружены мертвыми на 7-й день исследования. Одно животное, которому вводили антитело к pan-TGFβ в дозе 100 мг/кг было обнаружено мертвым на 6-й день исследования. Все животные, которым вводили Ab2 в дозе до 100 мг/кг, выживали до окончательного выведения из эксперимента.

Кроме того, определяли токсичность обработок путем мониторинга массы тела животных во время фазы дозирования. Как изображено на фиг. 20 и 21A-21C, животные, получавшие LY2109761 как в дозе 200 мг/кг, так и в дозе 300 мг/кг, характеризовались сниженной массой тела в течение исследования.

Массу органов животных также определяли посмертно. Как показано в табл. 11, повышенную массу сердца наблюдали у животных, которым вводили ≥200 мг/кг LY2109761. Повышенную массу сердца также наблюдали у животных, которым вводили ≥30 мг/кг антитела к pan-TGFβ. Эффектов в массе органов не наблюдали у животных, которым вводили Ab2 в дозе до 100 мг/кг.

Таблица 11

Изменения массы органов в группах обработки

	Группа обработки					
	Носитель Контроль[a]	**LY2109761**		**Антитело к pan-TGFβ**		
Уровень дозы (мг/кг/день)	0	200	300	3	30	100
Сердце						
Абсолютная масса (г)	0,4084	112	н.о.	99	123	119
Отношение к массе тела (%)	0,3952	132	н.о.	96	122	122
Отношение к массе мозга (%)	26,3420	113	н.о.	98	123	116

н.о.=не оценивали вследствие ранней смертности.

Примечание. Значения абсолютной массы и отношение массы органов (по отношению к телу или мозгу) для каждой группы обработки выражали в виде процента среднего значения контроля.

[a]Контроль носителем=фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), pH 7,4.

Несмотря на то, что не было обнаружено макроскопических данных у животных, которым вводили Ab2 или антитело к pan-TGFβ в дозе до 100 мг/кг, грудинную кость аномальной формы наблюдали у четырех животных каждой группы обработки, получавших LY2109761 в дозе 200 мг/кг или 300 мг/кг. 2,5 мл прозрачной жидкости в грудной полости и увеличенный тимус в результате избытка жидкости (т.е., отек) наблюдали у одного животного, которому вводили LY2109761 в дозе 300 мг/кг, которое было обнаружено мертвым на 3-й день исследования.

Как показано в табл. 12, на микроскопическом уровне животным, которым вводили LY2109761 ≥ в дозе 200 мг/кг характеризовались данными в отношении сердечных клапанов (т.е. вальвулопатией). Вальвулопатия характеризовалась утолщением сердечных клапанов в результате кровоизлияния, эндотелиальной гиперплазии, инфильтратов из смешанных воспалительных клеток и/или стромальной гиперплазии (см. фиг. 23, верхняя правая панель). Большинство животных имело несколько пораженных клапанов. Кроме того, наблюдали данные в отношении предсердий, в том числе минимальные или незначительные инфильтраты из смешанных воспалительных клеток, минимальное кровоизлияние и/или минимальная эндотелиальная (эндокардиальная) гиперплазия, приводящая к повышенному базофильному окрашиванию предсердия в срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Также наблюдали данные в отношении миокарда преимущественно в основании сердца и они состояли из минимальной или незначительной дегенерации/некроза, незначительного кровоизлияния и/или незначительных инфильтратов из смешанных воспалительных клеток. Одно животное, которому вводили LY2109761 в дозе 300 мг/кг, характеризовалось незначительным некрозом с воспалением коронарной артерии. Кроме того, двое животных, которым вводили LY2109761 в дозе 200 мг/кг, характеризовались минимальными инфильтратами из воспалительных клеток или кровоизлиянием в области корня аорты.

Таблица 12

Микроскопические изменения в области сердца у животных, получавших LY2109761

	LY2109761		
Уровень дозы (мг/кг/день)	0	200	300
Сердце			
Сердечные клапаны			
Вальвулопатия			
Минимальная	0	1	2
Незначительная	0	3	3
Умеренная	0	1	0
Предсердие			
Инфильтрат, смешанные клетки			
Минимальный	0	2	3
Незначительный	0	0	1
Гиперплазия, эндотелий			
Минимальная	0	1	3
Кровоизлияние			
Минимальное	0	1	2
Миокард			
Дегенерация/некроз			
Минимальные	0	0	1
Незначительные	0	1	1
Кровоизлияние			
Незначительное	0	1	0
Инфильтрат, смешанные клетки			
Незначительное	0	0	1
Коронарная артерия			
Некроз с воспалением			
Незначительный	0	0	1
Корень аорты			
Кровоизлияние			
Минимальное	0	1	0
Инфильтрат, смешанные клетки			
Минимальное	0	1	0

Как показано в табл. 13, животные, которым вводили антитело к pan-TGFβ ≥ в дозе 3 мг/кг характеризовались данными в отношении сердечных клапанов (т.е. вальвулопатией), аналогичными таковым, описанным для животных, которым вводили LY2109761, как описано выше (см. также фиг. 23, нижняя левая панель). Животные, которым вводили антитело к pan-TGFβ в дозе ≥30 мг/кг, характеризовались данными в отношении предсердий, аналогичными таковым, описанным у животных, которым вводили LY2109761. Животные, которым вводили антитело к pan-TGFβ в дозе 100 мг/кг, характеризовались данными в отношении миокарда, аналогичными таковым, описанным у животных, которым вводили LY2109761, и животные, которым вводили антитело к pan-TGFβ в дозе 30 мг/кг, характеризовались кровоизлиянием в миокард. Одно животное, которому вводили антитело к pan-TGFβ в дозе 100 мг/кг, характеризовалось умеренным интрамуральным некрозом с кровоизлиянием в коронарную артерию, который был ассоциировано с незначительными периваскулярными инфильтратами из смешанными воспалительных клеток.

Таблица 13

Микроскопические данные в отношении сердца у животных, получавших антитело к pan-TGFβ

	Антитело к pan-TGFβ			
Уровень дозы (мг/кг/день)	0	3	30	100
Сердце				
Сердечные клапаны				
Вальвулопатия				
Минимальная	0	2	0	0
Незначительная	0	2	4	5
Умеренная	0	0	1	0
Предсердие				
Инфильтрат, смешанные клетки				
Минимальный	0	0	1	2
Незначительный	0	0	1	1
Гиперплазия, эндотелий				
Минимальная	0	0	3	1
Кровоизлияние				
Минимальное	0	0	1	0
Миокард				
Дегенерация/некроз				
Незначительные	0	0	0	2
Кровоизлияние				
Минимальное	0	0	2	1
Незначительное	0	0	1	1
Инфильтрат, смешанные клетки, основание				
Незначительный	0	0	0	1
Коронарная артерия				
Некроз с кровоизлиянием				
Умеренный	0	0	0	1
Инфильтрат, смешанные клетки, перивасулярный				
Незначительный	0	0	0	1

В отличие от этого, одно животное в группе обработки, которому вводили Ab2 в дозе 100 мг/кг, характеризовалось минимальными инфильтратами из смешанных воспалительных клеток в одной створке сердечного клапана левого атриовентрикулярного клапана (см. фиг. 23, нижняя правая панель), что соответствовало исходным данным вследствие одного случая и отсутствия сопутствующих данных в отношении клапанов. Таким образом, обработка Ab2 неожиданным образом приводила к сниженной смертности и сниженной кардиотоксичности по сравнению с обработкой ингибитором ALK5-киназы LY2109761 или обработкой антителом к pan-TGFβ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения фармацевтической композиции, включающий этапы:

(i) получение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое:

(a) содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем:

CDRH1 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 2;

CDRH2 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 4;

CDRH3 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 6;

CDRL1 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8;

CDRL2 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10; и

CDRL3 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 12;

(b) содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем:

CDRH1 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1;

CDRH2 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3;

CDRH3 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5;

CDRL1 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 7;

CDRL2 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 9; и

CDRL3 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 11; или

(c) конкурирует или перекрестно конкурирует с антителом, которое определено в подпунктах (a) или (b), за связывание с TGFβ1, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает следующие

про/латентные комплексы TGFβ1: LTBP1-TGFβ1, LTBP3-TGFβ1, GARP-TGFβ1 или LRRC33-TGFβ1, и ингибирует высвобождение зрелого TGFβ1 из про/латентного комплекса, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связывает TGFβ2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, или TGFβ3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и не связывает свободный зрелый TGFβ1, который не ассоциирован с про/латентным комплексом, и где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой изоформно-специфический ингибитор активации TGFβ1, который не вызывает токсичности для сердечно-сосудистой системы, ассоциированной с ингибированием TGFβ у субъекта при его введении субъекту в терапевтически эффективной дозе; и

(ii) составление в фармацевтическую композицию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полученных на этапе (i), и фармацевтически приемлемого наполнителя.

2. Способ по п.1, где фармацевтическая композиция применяется для лечения рака, миелофиброза или фиброзирующего заболевания, или при показаниях.

3. Способ по п.1 или 2, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно подпункту (a) содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 17, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 18, или где антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно подпункту (b) содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 13, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 14.

4. Способ по любому из пп.1, 2 или 3, где указанный ингибитор снижает супрессорную активность регуляторных Т-клеток.

5. Способ по любому из пп.1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует высвобождение зрелого TGFβ1 из комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и комплекса LRRC33-TGFβ1.

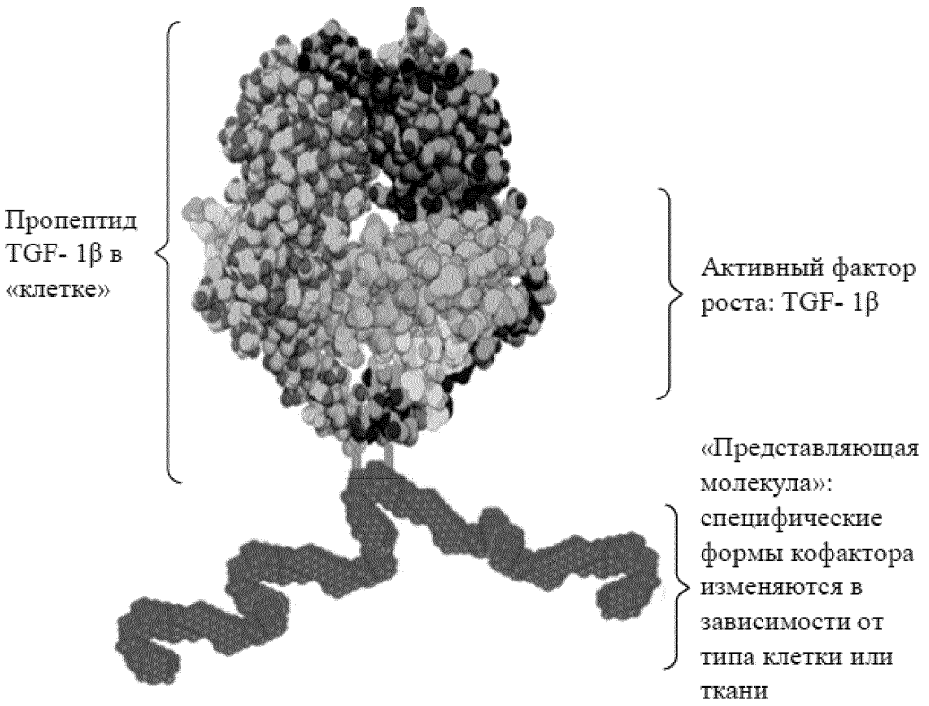
6. Способ по любому из пп.1-5, где указанный ингибитор ингибирует или уменьшает рост солидной опухоли.

7. Способ по п.6, где солидная опухоль представляет собой десмопластическую опухоль.

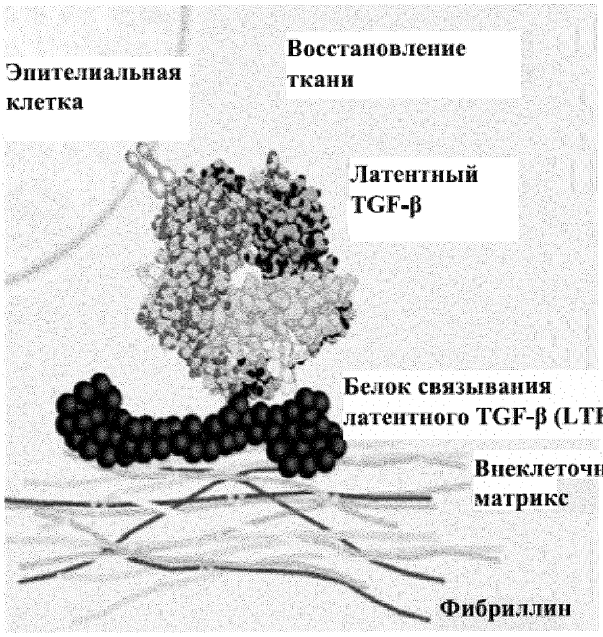
8. Способ по любому из пп.2-6, где злокачественная опухоль представляет собой рак или опухоль, встречающиеся в толстой кишке, анальном отверстии, мочевом пузыре, желчном протоке, костной ткани, головном мозге, молочной железе, шейке матки, прямой кишке, эндометрии, пищеводе, глазе, желчном пузыре, голове и шее, печени, почке, гортани, легком, средостении (грудной клетке), ротовой полости, яичниках, поджелудочной железе, мужском половом члене, предстательной железе, коже, тонком кишечнике, желудке, спинном мозге, копчике, семенниках, щитовидной железе или матке.

9. Фармацевтическая композиция, полученная способом по любому из пп.1-8.

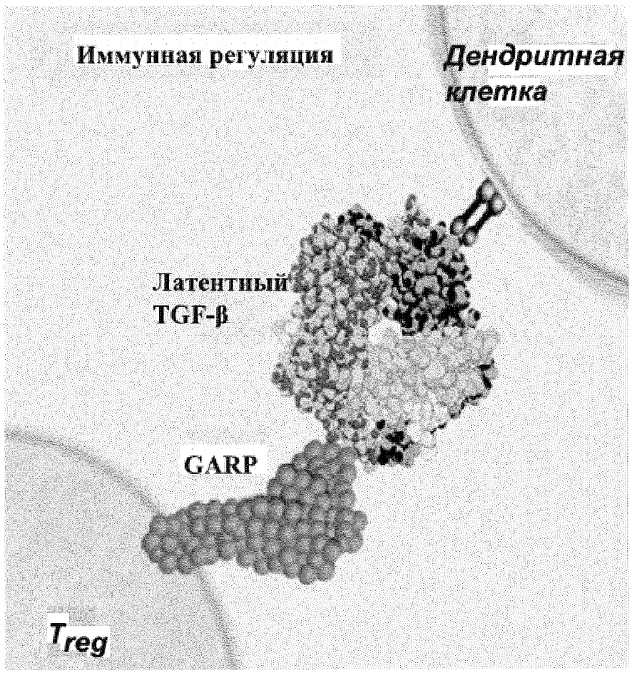
10. Фармацевтическая композиция по п.9, где фармацевтическая композиция применяется для лечения рака, миелофиброза или фиброзирующего заболевания, или при показаниях.



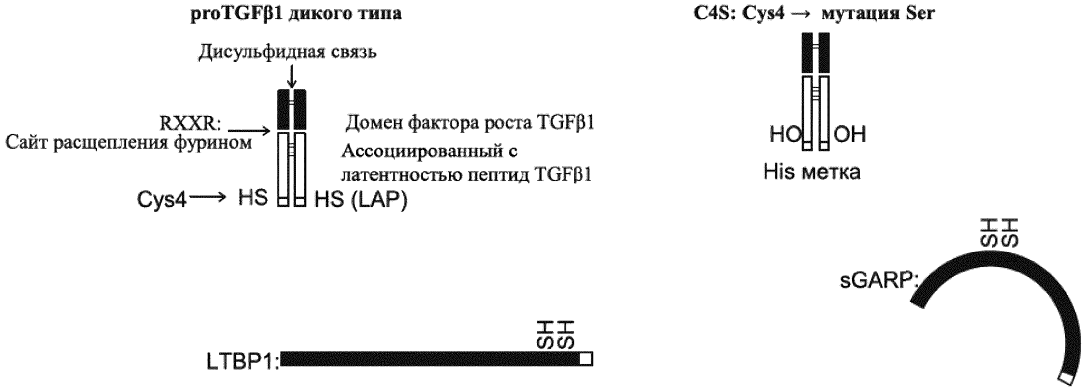
Фиг. 1



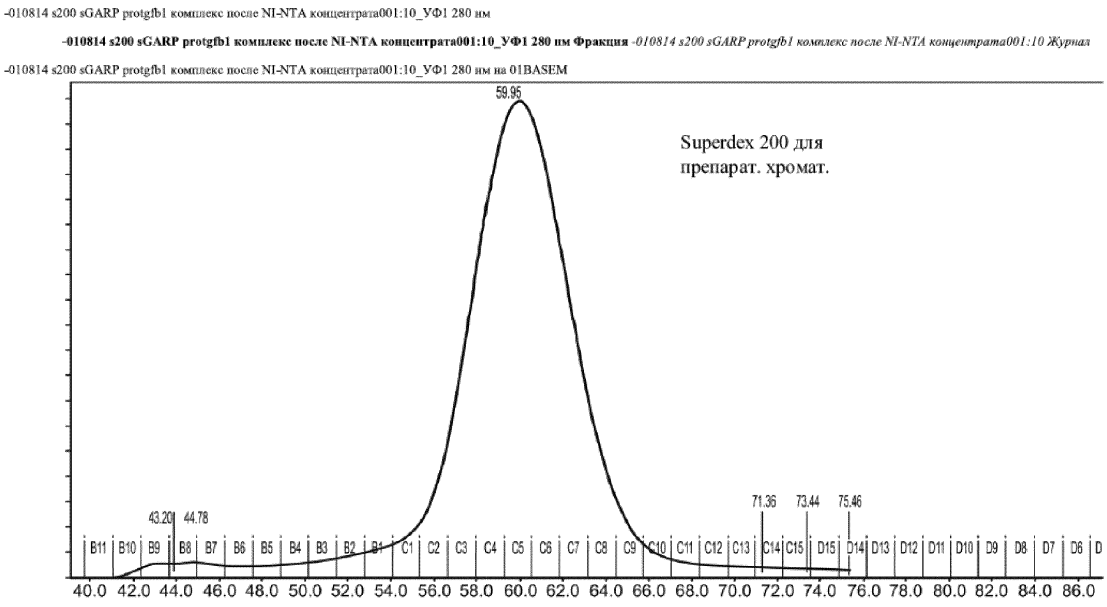
Фиг. 2A



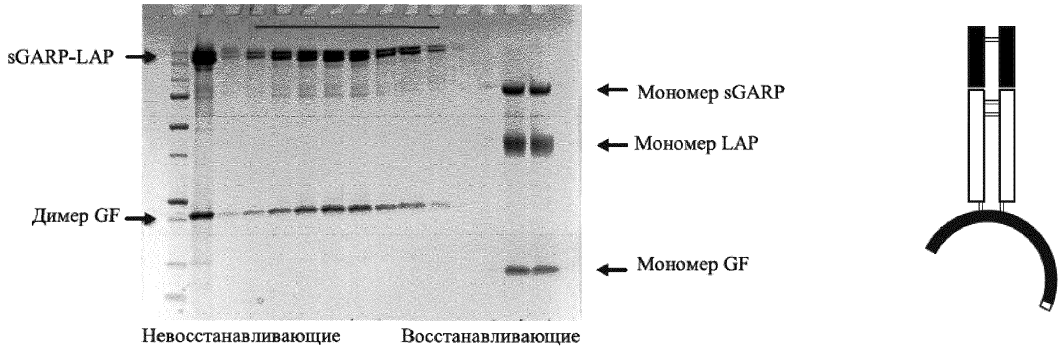
Фиг. 2B



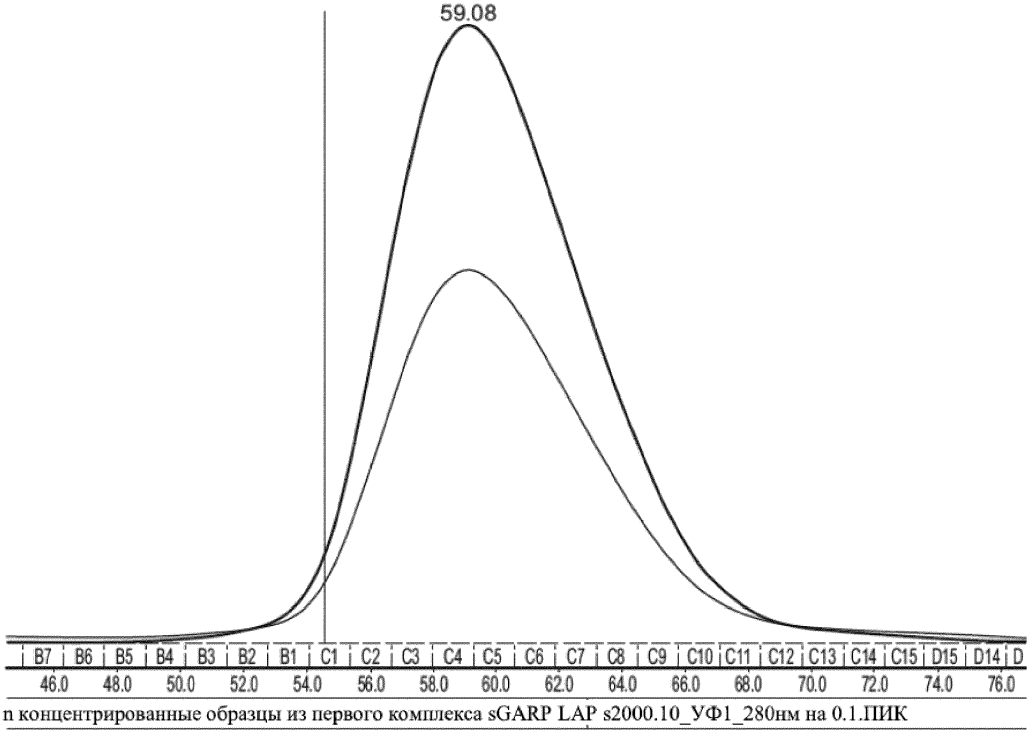
Фиг. 3



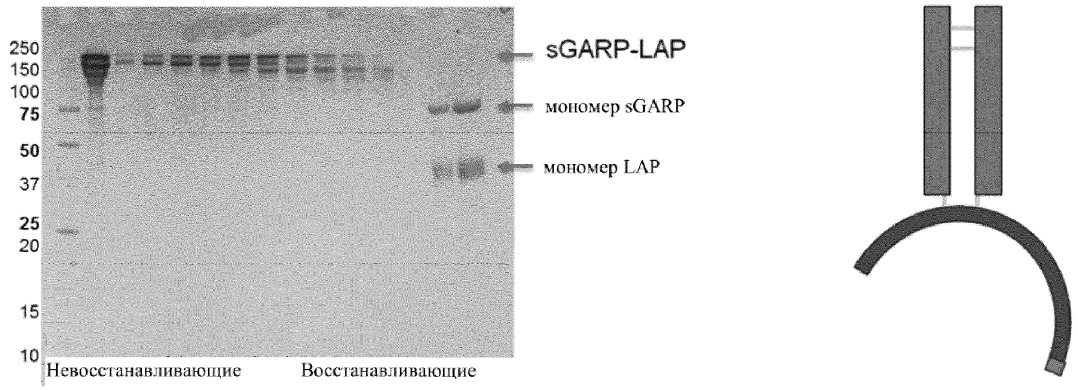
Фиг. 4A



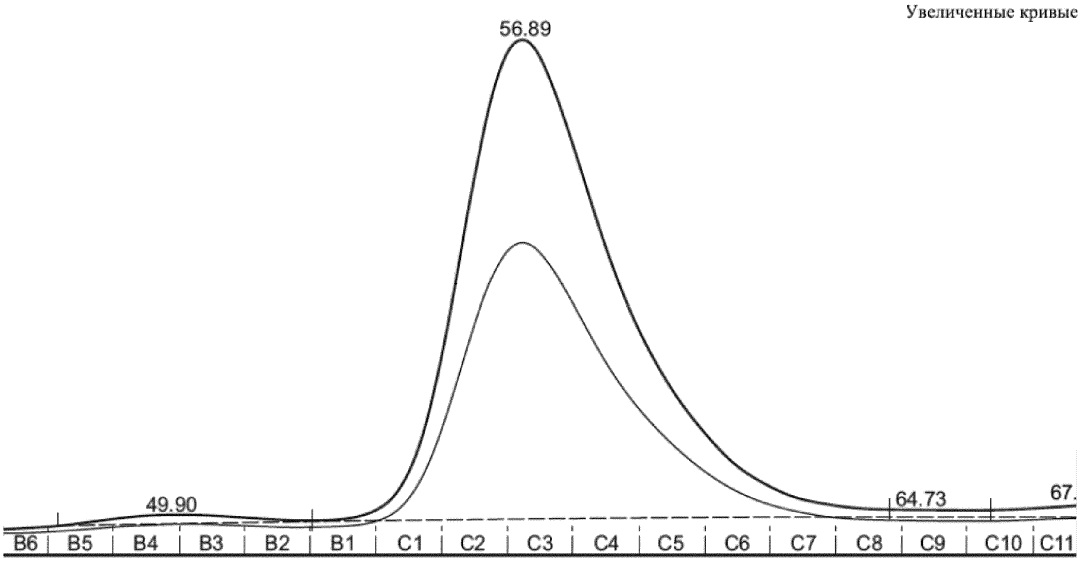
Фиг. 4B



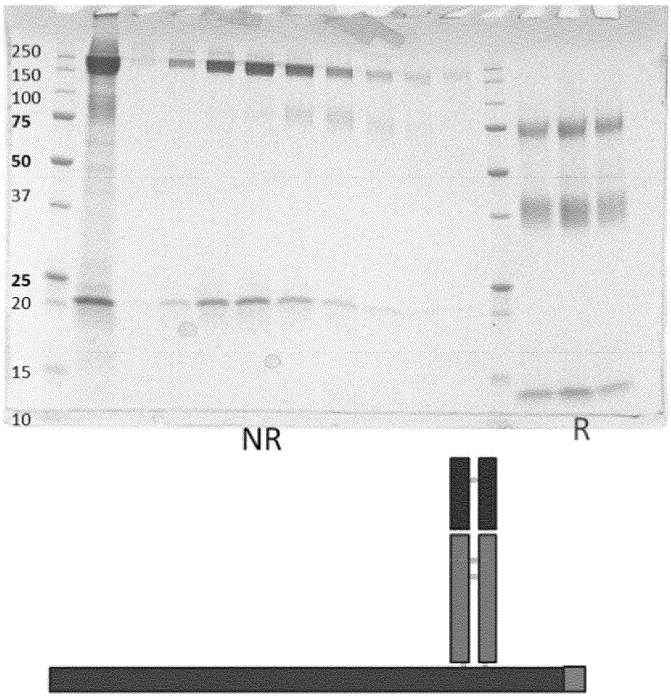
Фиг. 5A



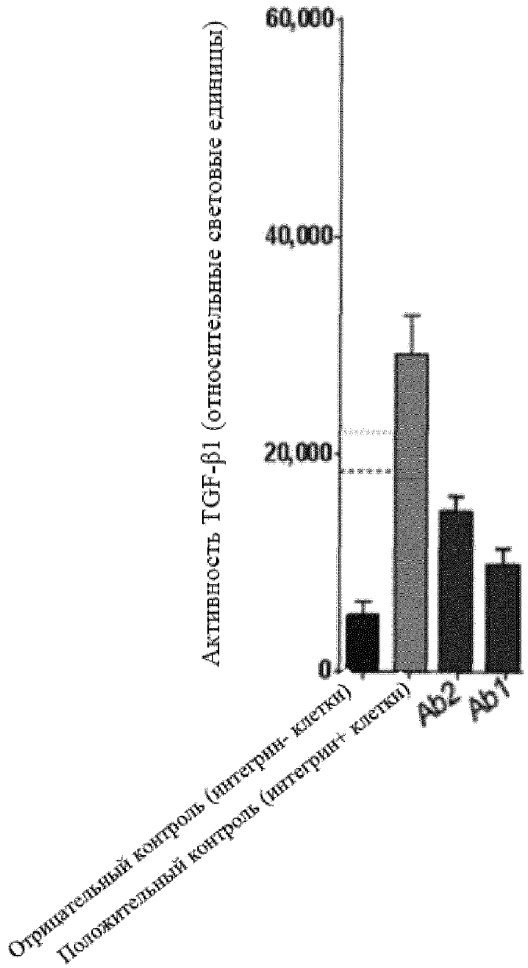
Фиг. 5B



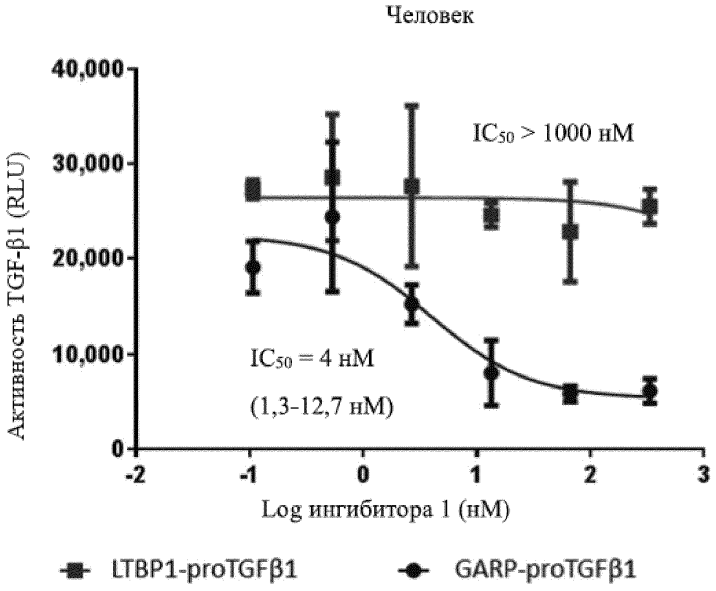
Фиг. 6A



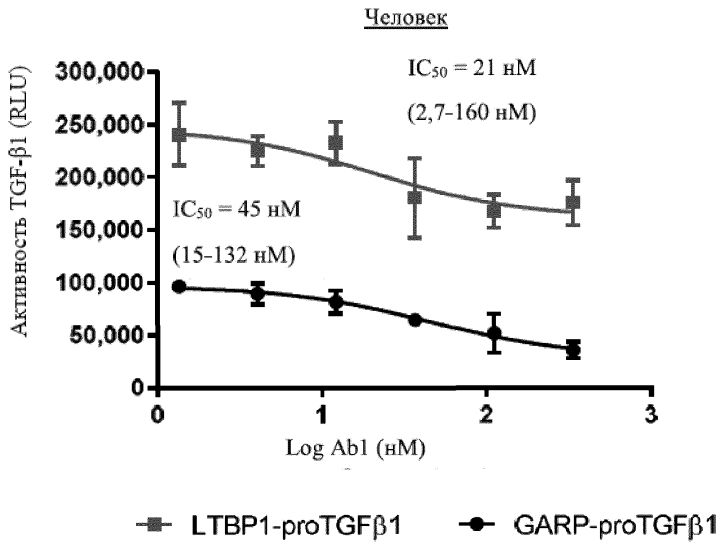
Фиг. 6B


60,000
40,000
20,000
0
Активность TGF-β1 (относительные световые единицы)
Отрицательный контроль (интегрин- клетки)
Положительный контроль (интегрин+ клетки)
Ab2
Ab1

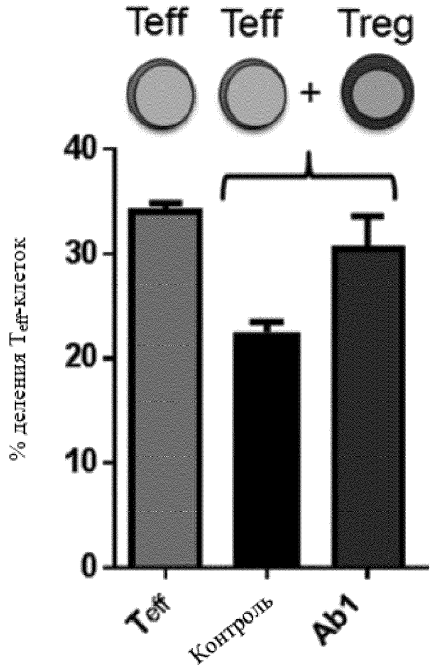
Фиг. 7


Человек
40,000
30,000
20,000
10,000
0
Активность TGF-β1 (RLU)
IC50 > 1000 нМ
IC50 = 4 нМ
(1,3-12,7 нМ)
-2
-1
0
1
2
3
Log ингибитора 1 (нМ)
LTBP1-proTGFβ1
GARP-proTGFβ1

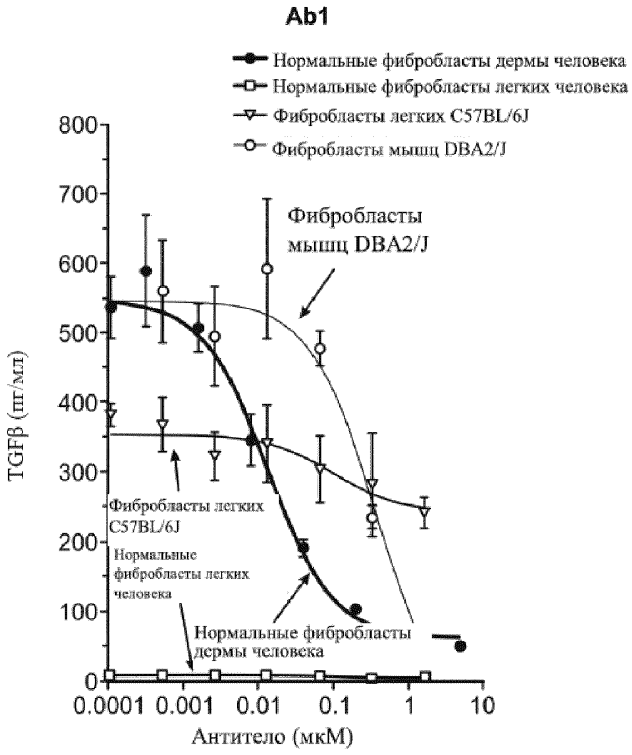
Фиг. 8


Человек
IC50 = 21 нМ
(2,7-160 нМ)
IC50 = 45 нМ
(15-132 нМ)
Активность TGF-β1 (RLU)
300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
0
1
2
3
Log Ab1 (нМ)
LTBP1-proTGFβ1
GARP-proTGFβ1

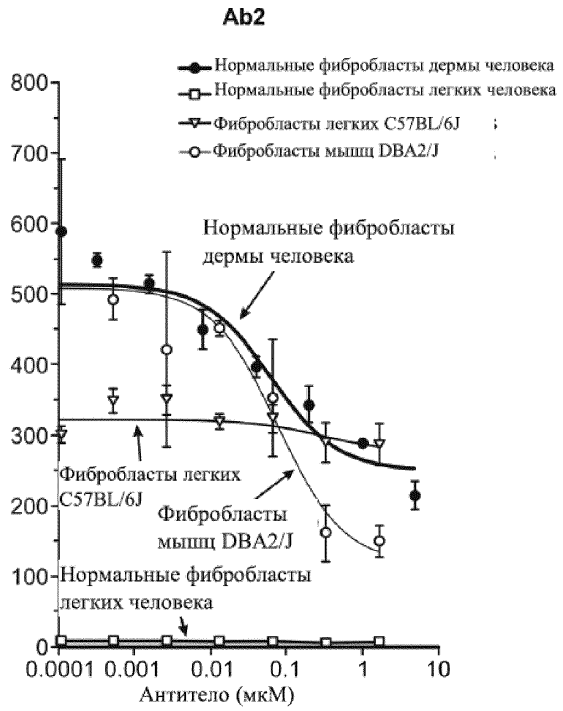
Фиг. 9


Teff
Teff
Treg
+
% деления Teff-клеток
40
30
20
10
0
Teff
Контроль
Ab1

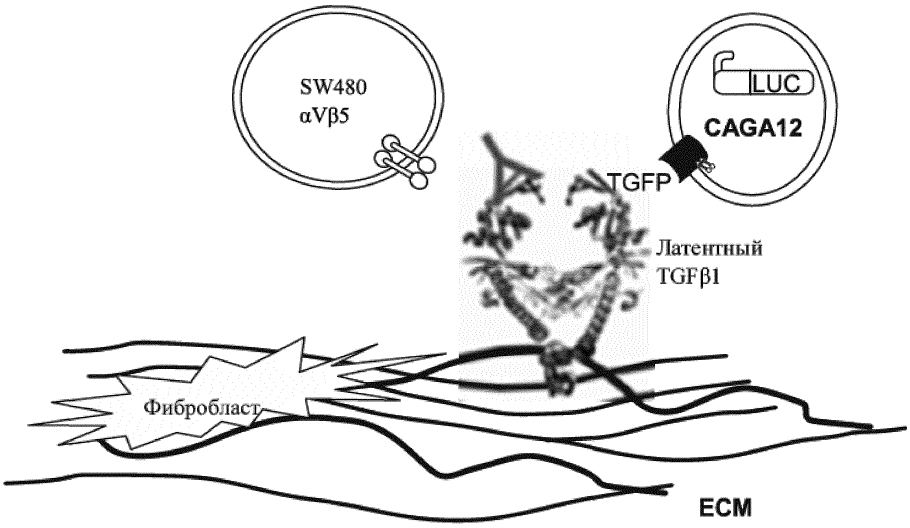
Фиг. 10



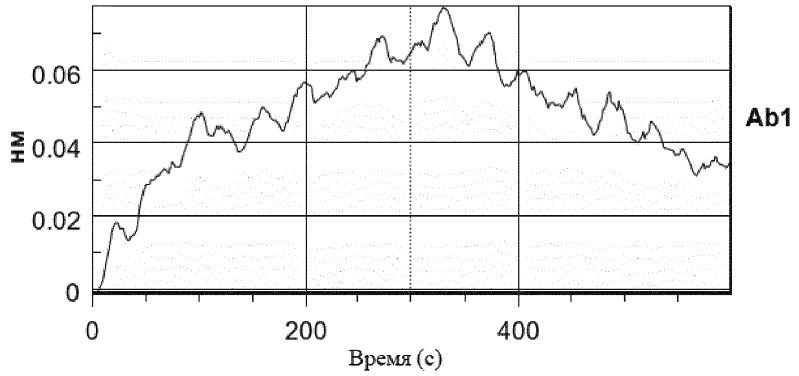
Фиг. 11А



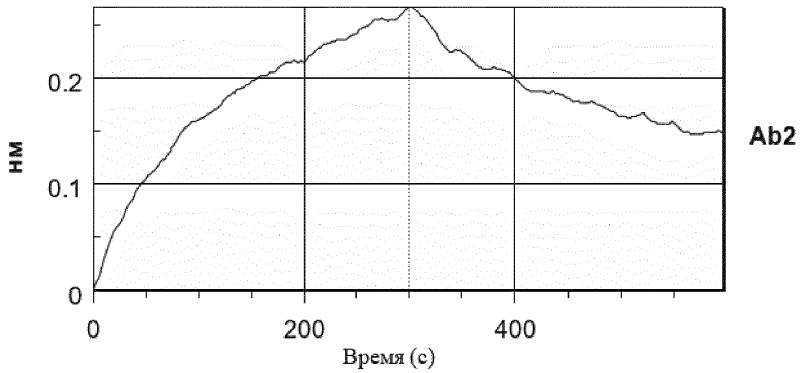
Фиг. 11В



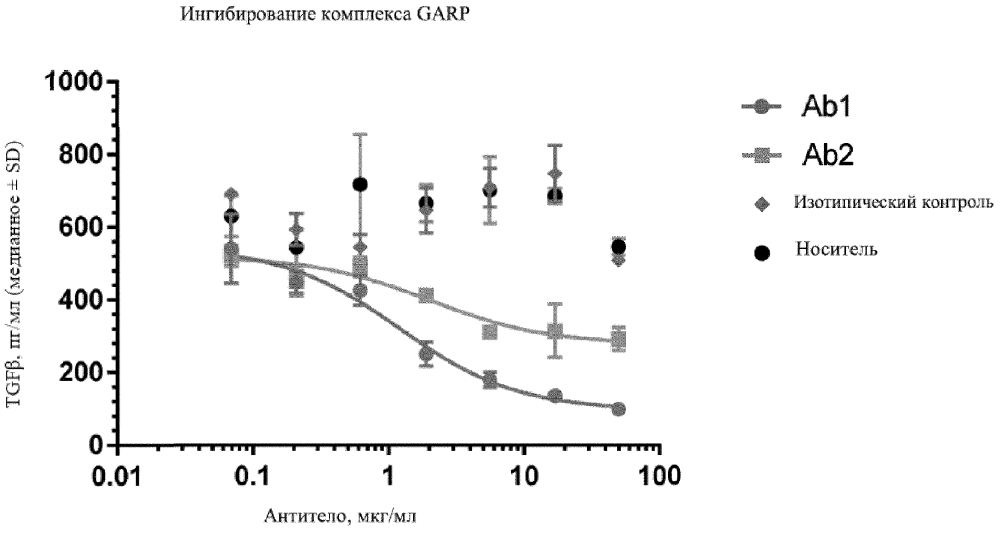
Фиг. 11C



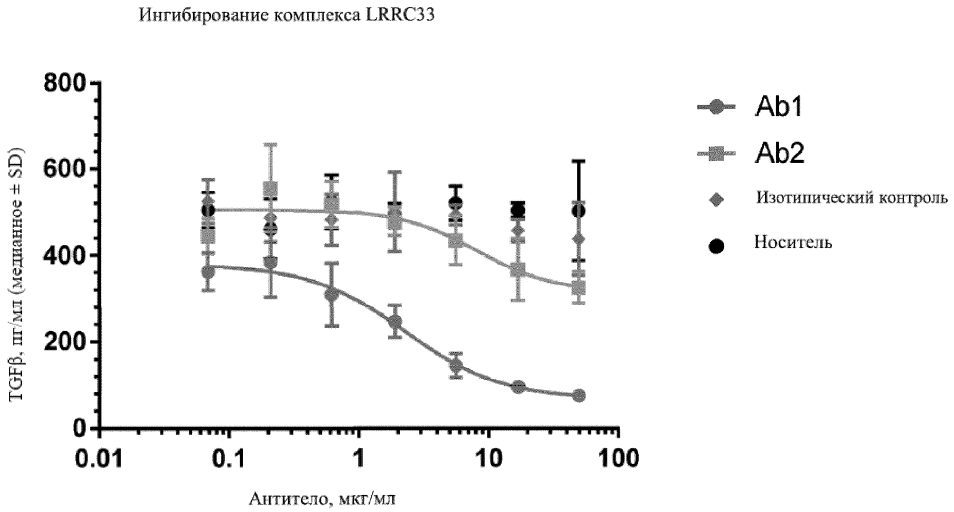
Фиг. 12A



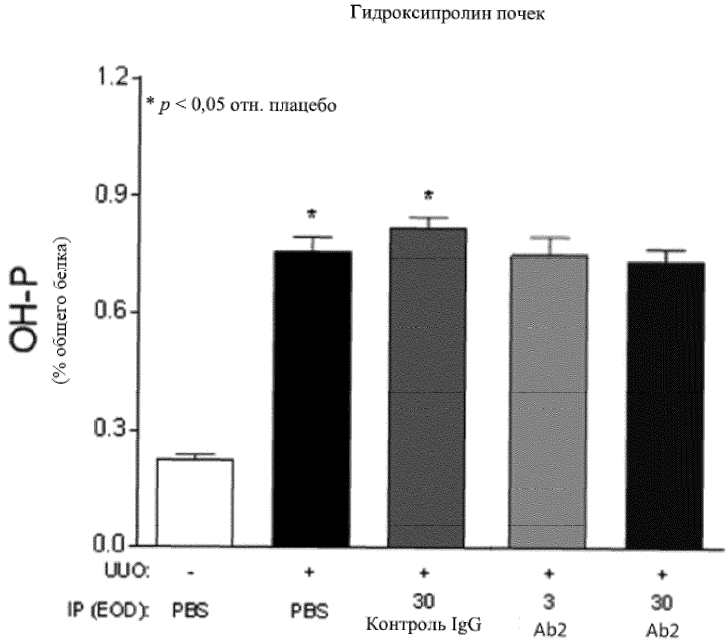
Фиг. 12B



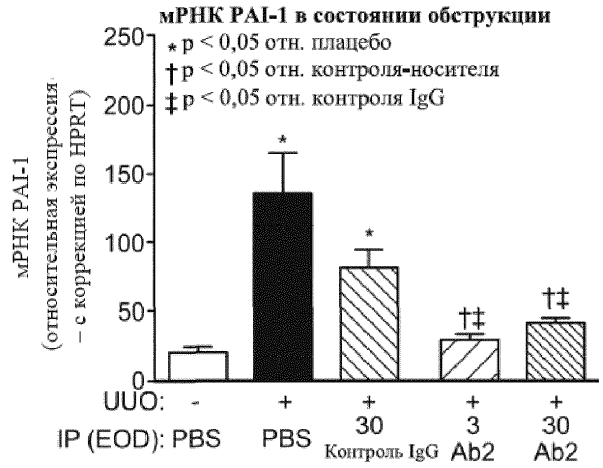
Фиг. 13A



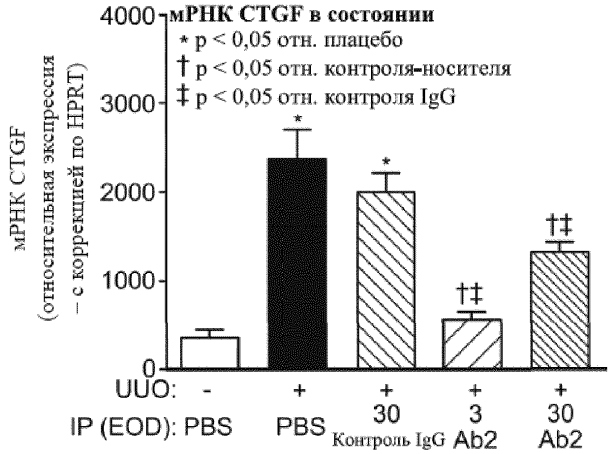
Фиг. 13B



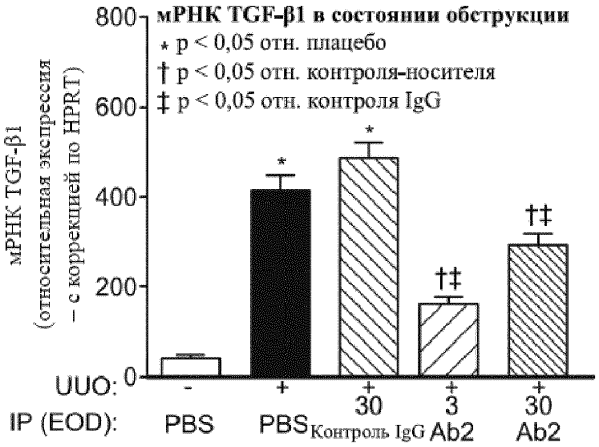
Фиг. 14



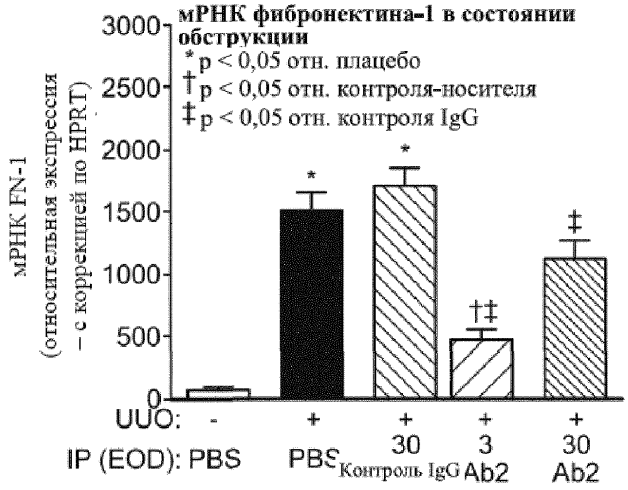
Фиг. 15A



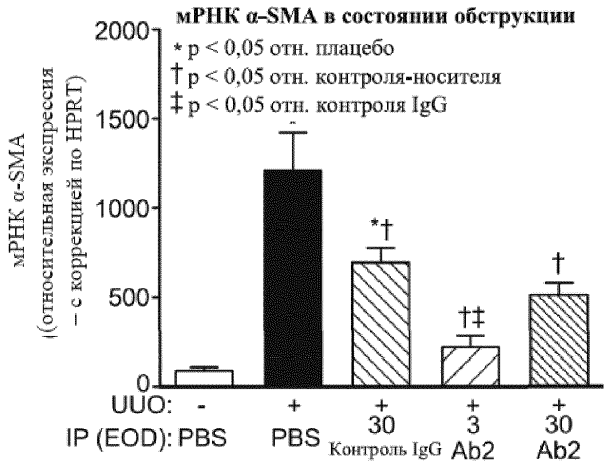
Фиг. 15B



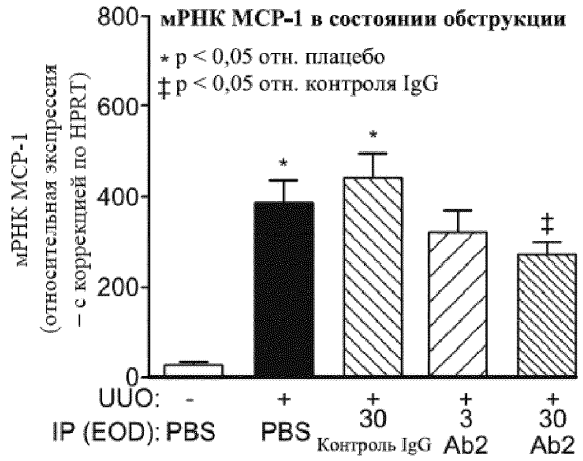
Фиг. 15C



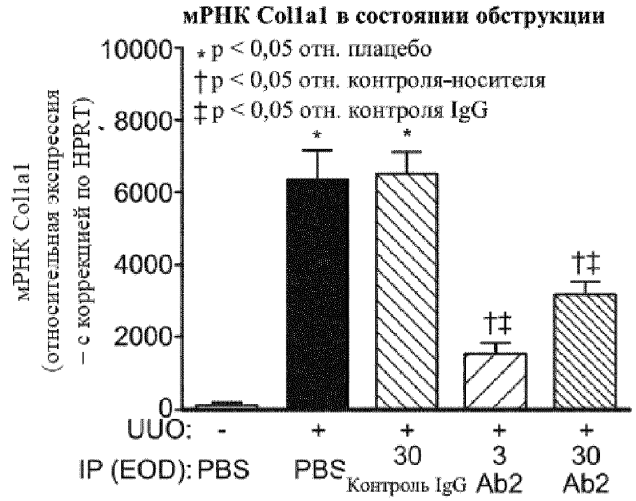
Фиг. 15D



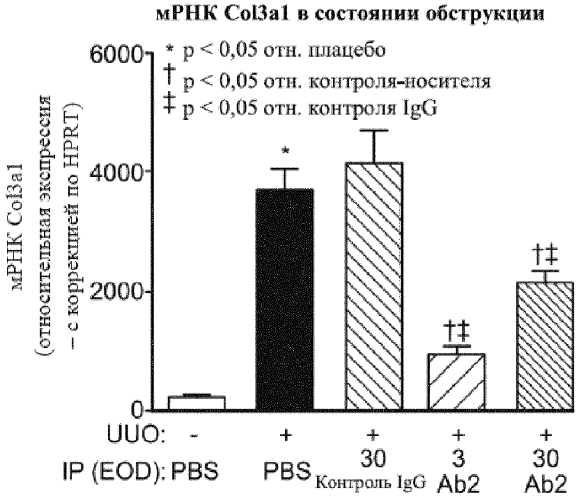
Фиг. 15E



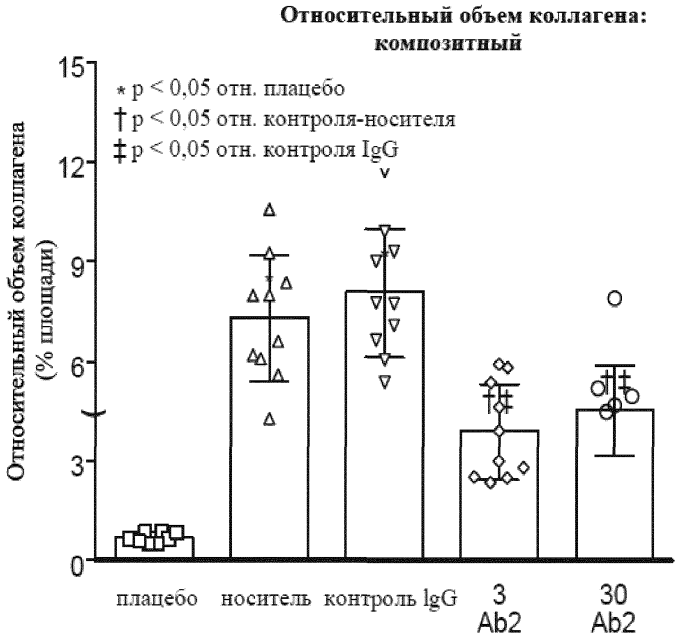
Фиг. 15F



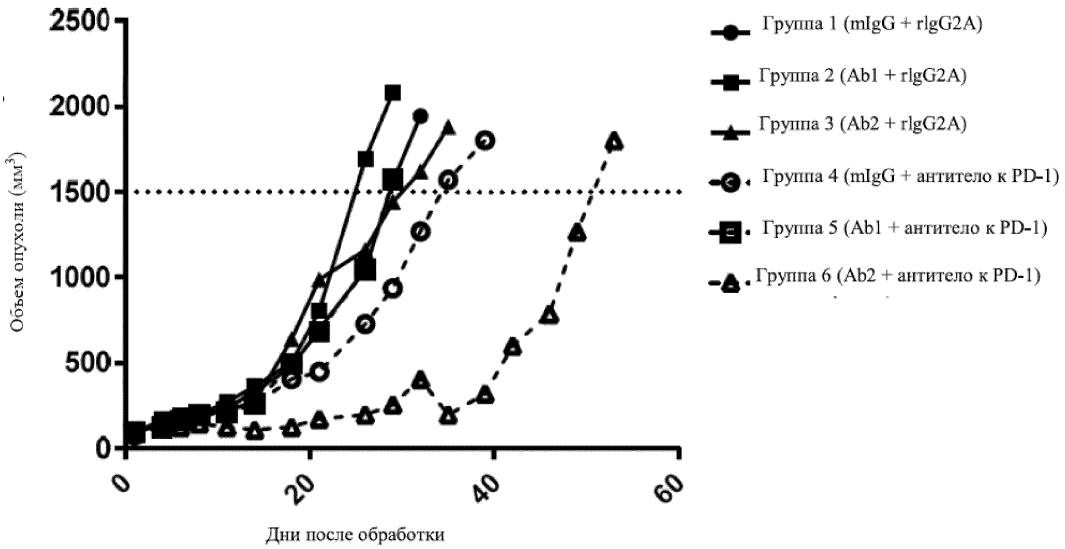
Фиг. 15G



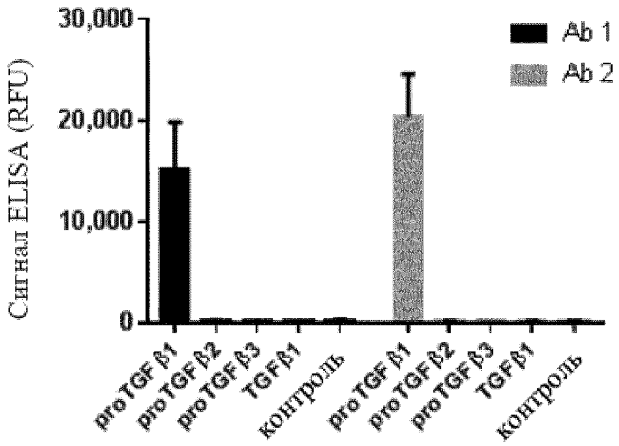
Фиг. 15H



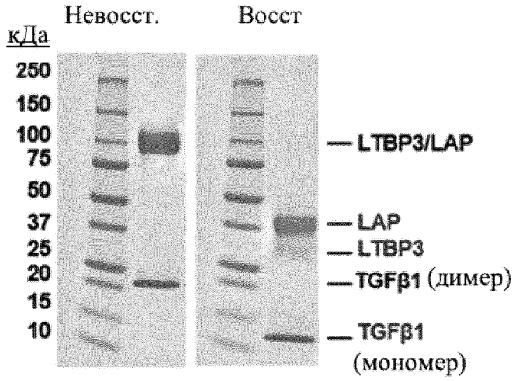
Фиг. 16



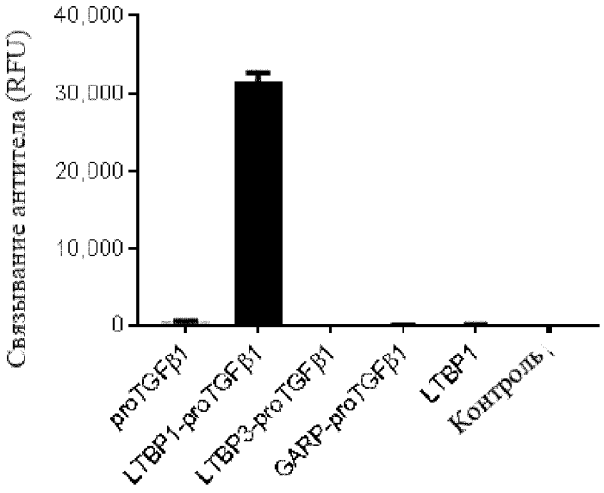
Фиг. 17



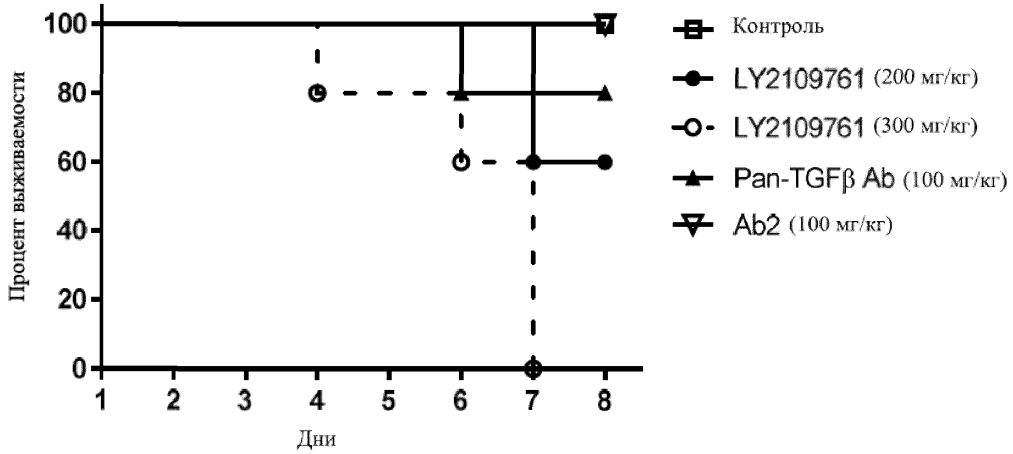
Фиг. 18A



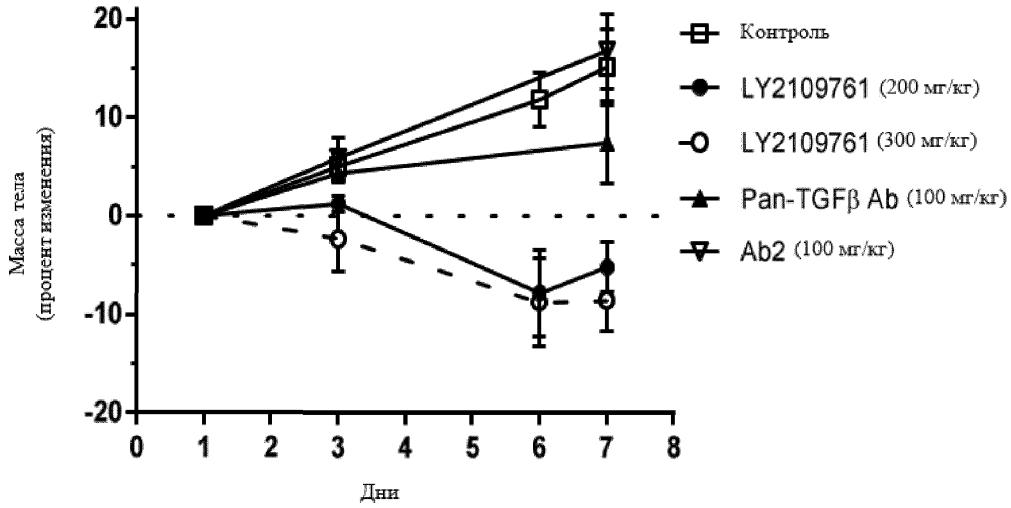
Фиг. 18B



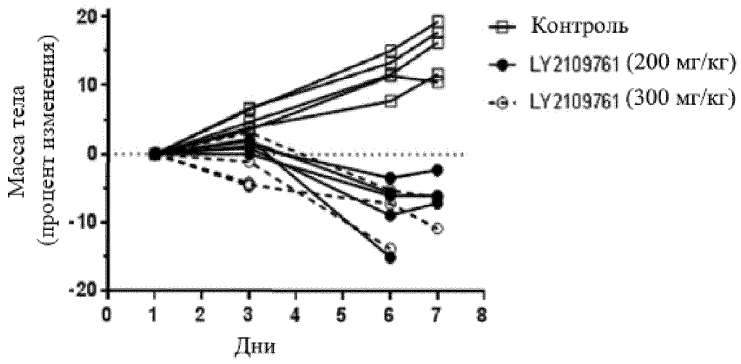
Фиг. 18C



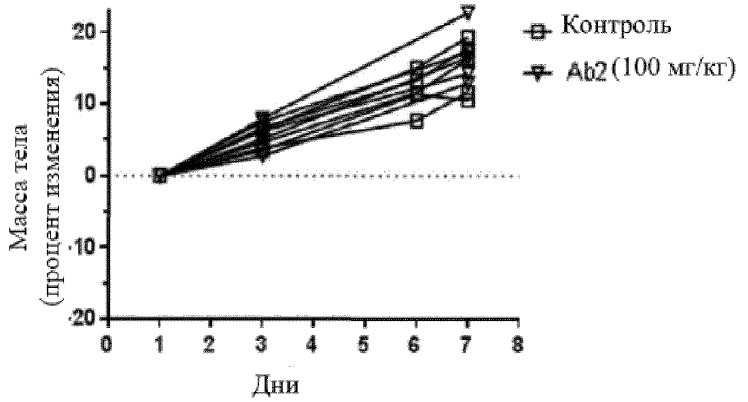
Фиг. 19



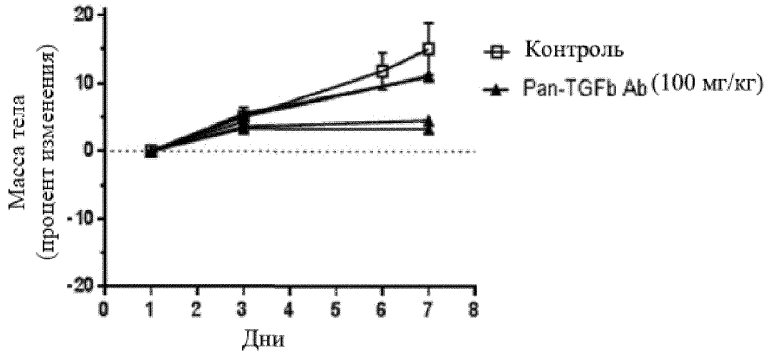
Фиг. 20



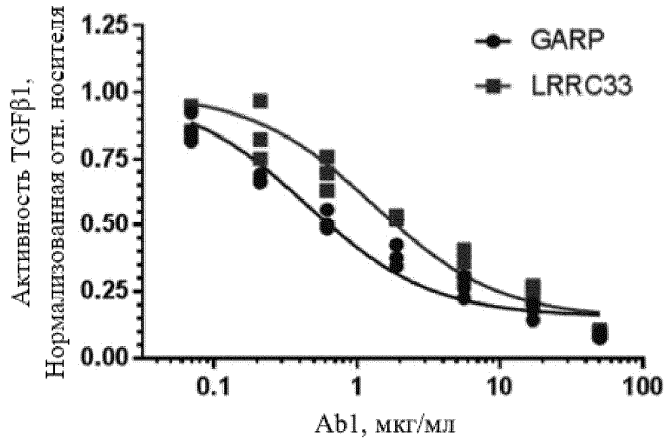
Фиг. 21A



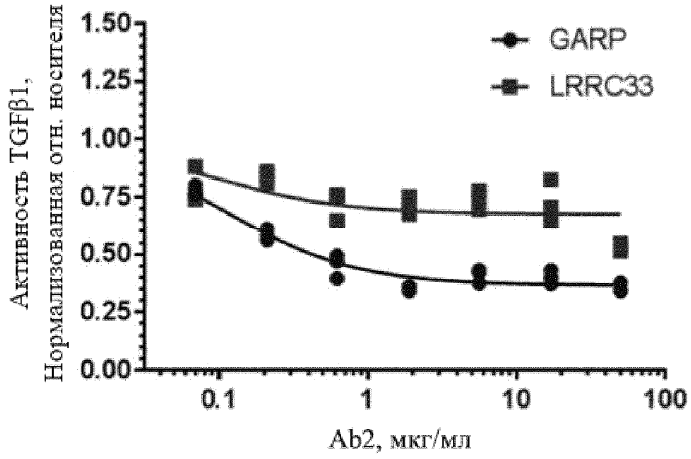
Фиг. 21C



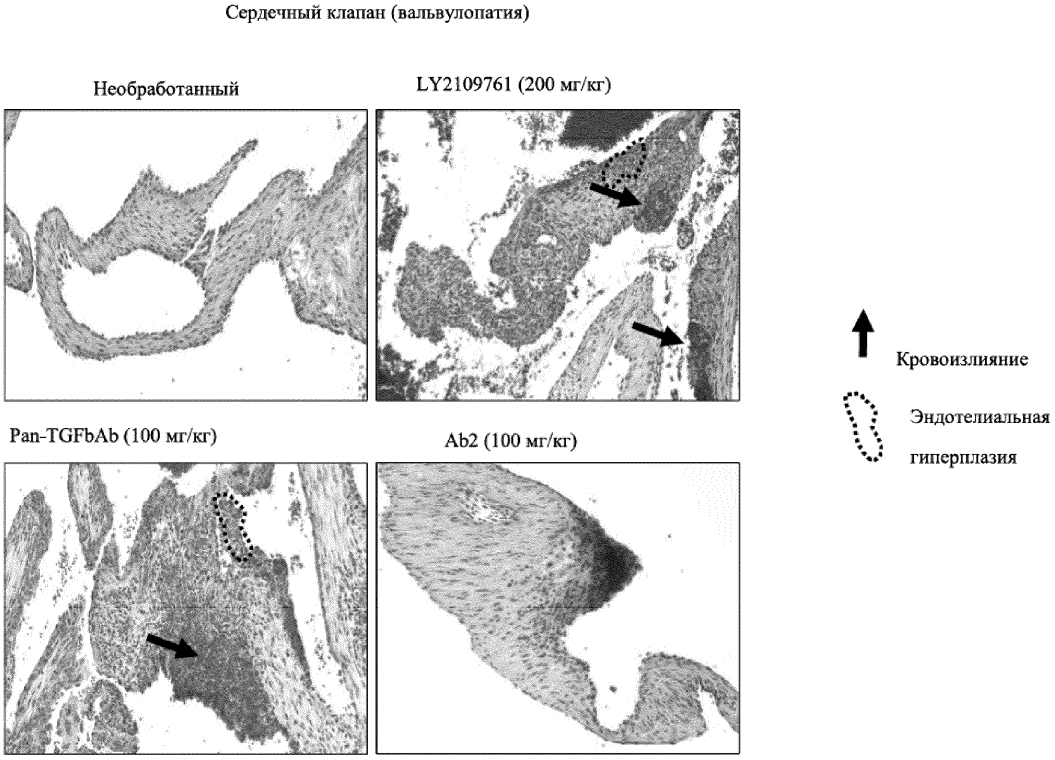
Фиг. 21B



Фиг. 22A



Фиг. 22B



Фиг. 23