



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019013908-7 A2



(22) Data do Depósito: 05/01/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 04/02/2020

(54) **Título:** INIBIDORES DE TGFSS1 ISOFORMA-ESPECÍFICOS, CONTEXTO-PERMISSIVOS, E SEUS USOS

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

(30) **Prioridade Unionista:** 02/06/2017 US 62/514,417; 06/01/2017 US 62/443,615; 07/07/2017 US 62/529,616; 13/09/2017 US 62/558,311; 13/11/2017 US 62/585,227; (...).

(71) **Depositante(es):** SCHOLAR ROCK, INC..

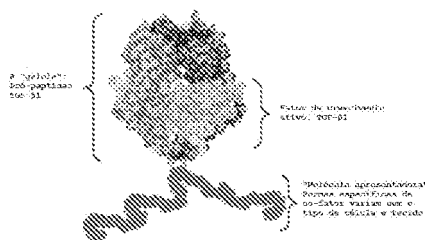
(72) **Inventor(es):** THOMAS SCHURPF; ABHISHEK DATTA; GREGORY J. CARVEN; CONSTANCE MARTIN; ASHISH KALRA; KIMBERLY LONG; ALAN BUCKLER.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018012601 de 05/01/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/129329 de 12/07/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 04/07/2019

(57) **Resumo:** É revelado nesse relatório descritivo o uso terapêutico de inibidores de TGFβ1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, no tratamento de doenças que envolvem desregulação de TGFβ1.



**INIBIDORES DE TGF β 1 ISOFORMA-ESPECÍFICOS, CONTEXTO-
PERMISSIVOS, E SEUS USOS**

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Esse Pedido Internacional reivindica prioridade para e benefício sob 35 U.S.C. § 119(e) dos seguintes pedidos: Pedido U.S. Provisório N° 62/443.615, depositado em 6 de janeiro de 2017; Pedido U.S. Provisório N° 62/452.866, depositado em 31 de janeiro de 2017; Pedido U.S. Provisório N° 62/514.417, depositado em 2 de junho de 2017; Pedido U.S. Provisório N° 62/529.616, depositado em 7 de julho de 2017; Pedido U.S. Provisório N° 62/549.767, depositado em 24 de agosto de 2017; Pedido U.S. Provisório N° 62/558.311, depositado em 13 de setembro de 2017; Pedido U.S. Provisório N° 62/585.227, depositado em 13 de novembro de 2017; Pedido U.S. Provisório N° 62/587.964, depositado em 17 de novembro de 2017; e Pedido U.S. Provisório N° 62/588.626, depositado em 20 de novembro de 2017, cujos conteúdos são expressamente incorporados nesse relatório descritivo por referência em suas totalidades.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi submetida eletronicamente em formato ASCII e é incorporada pelo presente por referência em sua totalidade. A referida cópia em ASCII, criada em 5 de janeiro de 2018, é denominada 127036-02020_ST25.txt e tem 221.821 bytes de tamanho.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003] A superfamília de fatores de crescimento do fator de transformação de crescimento β (TGF β) está envolvida em diversas cascatas de sinalização que regulam diversos

processos biológicos incluindo, sem limitação: inibição do crescimento celular, homeostasia tecidual, remodelagem da matriz extracelular (ECM), transição de endotelial para mesenquimal (EMT), migração e invasão celulares e modulação/supressão imune, além de transição de mesenquimal para epitelial. Em relação à remodelagem da ECM, a sinalização de TGF β pode aumentar populações de fibroblastos e a deposição de ECM (por exemplo, colágenos). No sistema imune, o ligante de TGF β modula a função de célula T reguladora e a manutenção do crescimento e homeostasia da célula precursora imune. Em células epiteliais normais, TGF β é um inibidor do crescimento potente e promotor da diferenciação celular. No entanto, à medida que os tumores se desenvolvem e progridem, eles frequentemente perdem sua resposta de crescimento negativa ao TGF β . Nesse ambiente, TGF β pode se tornar um promotor do desenvolvimento tumoral em função de sua habilidade para estimular a angiogênese, alterar o ambiente estromal e induzir imunossupressão local e sistêmica. Por essas e outras razões, TGF β tem sido um alvo terapêutico para diversas indicações clínicas. Apesar dos muitos esforços feitos até hoje por vários grupos, o desenvolvimento clínico bem-sucedido de um produto terapêutico de TGF β tem sido desafiador.

[004] Observações de estudos pré-clínicos, incluindo em ratos e cães, revelaram algumas toxicidades associadas à inibição de TGF β *in vivo*. Além disso, embora vários inibidores de TGF β tenham sido desenvolvidos até hoje, a maioria dos programas clínicos que visam TGF β foi suspensa em consequência de efeitos colaterais (resumidos, por exemplo, em WO 2017/156500). Dessa forma, apesar das linhas

de evidências diretas e indiretas que apontam para o envolvimento da sinalização de TGF β na progressão de doenças como, por exemplo, câncer e fibrose, não há produtos terapêuticos de TGF β disponíveis no mercado que sejam seguros e eficazes.

[005] Entre os distúrbios proliferativos, a desregulação de TGF β também foi implicada na mielofibrose, que é um distúrbio da medula óssea caracterizado por mieloproliferação clonal, produção aberrante de citocinas, hematopoiese extramedular, e fibrose da medula óssea. Embora mutações somáticas em JAK2, MPL e CALR tenham sido identificadas na patogênese da doença, Ruxolitinib (Jakafi), que é um inibidor de JAK1/JAK2 aprovado pelo FDA) para o tratamento de mielofibrose, ele não demonstrou eficácia na melhora de fibrose estabelecida da medula óssea em pacientes.

[006] Dessa forma, são necessários métodos e composições aprimorados para inibição da sinalização de TGF β que possam ser usados para tratar eficazmente e com segurança doenças e distúrbios que envolvem TGF β 1 incluindo, por exemplo, distúrbios proliferativos (por exemplo, câncer), fibrose e inflamação.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[007] A presente invenção engloba o reconhecimento de que o bloqueio da ativação de TGF β em várias fontes pode fornecer efeitos clínicos maiores no tratamento de diversas doenças que envolvem tanto um aspecto da ECM quanto um aspecto imune da desregulação de TGF β . Consequentemente, são fornecidos neste relatório descritivo métodos aprimorados para o tratamento dessas doenças com inibidores de TGF β 1 que sejam superiores aos antagonistas de TGF β convencionais com

relação à sua seletividade de isoforma, amplitude de alvos moleculares dentro do nicho de uma doença, durabilidade dos efeitos e segurança.

[008] Um corpo de evidência apoia a noção de que muitas doenças manifestam perturbações complexas da sinalização de TGF β , que provavelmente envolvem participação de tipos de células heterogêneos que conferem efeitos diferentes da função de TGF β , que são mediados por suas interações com as denominadas moléculas apresentadoras. Foram identificadas pelo menos quatro dessas moléculas apresentadoras, que podem "apresentar" TGF β em vários nichos extracelulares para permitir sua ativação em resposta a estímulos locais. Em uma categoria, TGF β está depositado na ECM em associação com moléculas apresentadoras associadas à ECM, por exemplo, LTBP1 e LTBP3, que medeiam atividades de TGF β associadas à ECM. Em outra categoria, TGF β está aderido na superfície de células imunes, por meio de moléculas apresentadoras como, por exemplo, GARP e LRRC33, que medeiam algumas funções imunes. Essas moléculas apresentadoras exibem expressão, localização e/ou função diferencial em vários tecidos e tipos de células, indicando que o desencadeamento de eventos e o resultado final de ativação de TGF β irão variar, dependendo do microambiente. Com base na noção de que muitos efeitos de TGF β podem interagir e contribuir para a progressão de doença, agentes terapêuticos que possam antagonizar várias facetas da função de TGF β podem fornecer maior eficácia.

[009] Previamente, os inventores reconheceram que a inibição *isoforma-específica* (ao contrário da *pan*-inibição) de TGF β pode gerar perfis de segurança aprimorados do antagonismo ao TGF β *in vivo* (veja WO 2017/156500). Levando

isso consideração, os inventores buscaram desenvolver inibidores de TGF β 1 que sejam: i) isoforma-específicos; e, ii) capazes de visar amplamente múltiplos complexos da sinalização de TGF β 1 que estão associados com moléculas apresentadoras diferentes, como agentes terapêuticos para condições dirigidas por efeitos multifacetados de TGF β 1 e sua desregulação.

[010] Consequentemente, a presente revelação fornece agentes inibidores isoforma-específicos capazes de visar tanto TGF β 1 associado à ECM quanto TGF β 1 associado à célula imune bloqueando, dessa forma, *várias fontes* de TGF β 1 apresentado em *múltiplos contextos*. Esses agentes inibidores são referidos nesse relatório descritivo como inibidores de TGF β 1 "*isoforma-específicos, contexto-permissivos*". A invenção também fornece uso desses agentes como um produto terapêutico no tratamento de condições que são caracterizadas por desregulação da sinalização de TGF β 1 associada com múltiplos aspectos da função de TGF β 1. Esses inibidores podem funcionar como agentes multifuncionais para antagonizar múltiplas atividades de TGF β 1 (por exemplo, TGF β 1 de várias fontes ou contextos) para aumentar os efeitos clínicos no contexto de fibrose, mielofibrose, câncer, e outras condições.

[011] A lógica para o uso vantajoso de inibidores de TGF β 1 *contexto-permissivos* (por exemplo, *contexto-independente*) em relação aos inibidores de TGF β 1 *contexto-específicos* como um produto terapêutico para tratar certas doenças (como descrito em mais detalhes nesse relatório descritivo) incluem os seguintes:

[012] *Envolvimento de complexos de TGF β 1 heterogêneos em*

um ambiente de doença: Primeiro, várias doenças envolvem populações heterogêneas de células como várias fontes de TGF β 1 que coletivamente contribuem para a patogênese e/ou progressão da doença. Mais de um tipo de complexos que contêm TGF β 1 ("contextos") provavelmente coexiste dentro do mesmo microambiente de doença. Em particular, essas doenças podem envolver tanto um componente da ECM da sinalização de TGF β 1 e quanto um componente imune da sinalização de TGF β 1. Nessas situações, o direcionamento seletivo de um único contexto de TGF β 1 (por exemplo, TGF β 1 associado com um tipo de molécula apresentadora) pode oferecer alívio limitado. Em contraste, inibidores de TGF β 1 contexto-permissivos visam vantajosamente mais amplamente complexos de TGF β 1 inativos (pró/Latentes)-alvo e evitam a ativação do fator de crescimento em várias fontes antes que o TGF β 1 maduro possa ser liberado para ligação ao receptor para desencadear sinalização a jusante mantendo, ao mesmo tempo, a seletividade de isoforma para minimizar toxicidades.

[013] *Mecanismos comuns subjacentes a várias doenças:* Segundo, são observadas similaridades notáveis em características teciduais/celulares entre o estroma tumoral e tecidos fibróticos, indicando comunicação cruzada entre: i) fenótipos pró-fibróticos TGF β 1-dependentes; ii) fenótipos pró-tumorais TGF β 1-dependentes; e, iii) fenótipos imunossupressivos TGF β -dependentes, observados em diversas condições patológicas. Dessa forma, o uso de inibidores contexto-permissivos que atuam amplamente sobre muitos desses constituintes pode fornecer efeitos terapêuticos ótimos através de tipos diversos de condições de doença. Por exemplo, manifestações clínicas de mielofibrose primária

incluem proliferação anormal de certas populações de células e fibrose na medula óssea.

[014] *Reação contra resistência farmacológica*: Terceiro, diversos estudos relataram câncer/tumores que são resistentes às terapias anticâncer, por exemplo, inibidores de *checkpoint* imune. Em alguns casos, essa resistência parece intrínseca ao tipo de câncer/tumor particular contra o nível de base do paciente (tipicamente referida como resistência inata, resistência primária, resistência intrínseca ou resistência inerente; esses termos são usados de forma intercambiável nesse relatório descritivo). Essa resistência pode ser representada em um subconjunto de pacientes pouco responsivos às terapias do câncer como, por exemplo, inibidores de *checkpoint* imune, e possivelmente reflete ambiente imune-excluído. Isso é provavelmente mediado, pelo menos em parte, por uma via $TGF\beta 1$ -dependente. Dessa forma, o inibidor isoforma-seletivo descrito nesse relatório descritivo pode tornar os cânceres resistentes mais responsivos a essas terapias.

[015] Alternativamente, a resistência pode se desenvolver ao longo do tempo, de tal modo que pacientes que exibem responsividade clínica material a um tratamento se tornam pouco responsivos (ou seja, resistência adaptiva ou adquirida). Por exemplo, foi relatado que a terapia de PD-1 pode levar à resistência adaptiva que está correlacionada com a supra-regulação de outros antígenos de célula T (por exemplo, componentes de TCR), sugerindo que células de câncer evoluem para evadir ao bloqueio de PD-1 por meio de outro mecanismo. Subsequentemente, um segundo inibidor de *checkpoint* que visa um componente diferente do receptor de

célula T como, por exemplo, TIM3, pode restaurar a responsividade à imunoterapia. Essas observações sugerem que o bloqueio de múltiplas vias para se contrapor às respostas adaptativas de células de câncer pode reduzir a probabilidade da habilidade de células de câncer para fugir da imunidade do hospedeiro. Inibidores de TGFβ1 contexto-permissivos que são capazes de visar múltiplos contextos de TGFβ1 podem vantajosamente contornar a resistência farmacológica adquirida por fornecimento de bloqueio em vários pontos da função de TGFβ1.

[016] *Oposição à plasticidade de expressão:* E, finalmente, com base na noção de que a expressão de várias moléculas apresentadoras pode variar ao longo do tempo, por exemplo, em resposta a pistas locais (por exemplo, citocinas, quimiocinas, ambiente da ECM etc.) e/ou com alterações em um microambiente de doença, é razoável que inibidores de TGFβ1 contexto-permissivos, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo, possam ser usados para se opor a essa plasticidade e fornecer efeitos inibidores amplos, duráveis, até mesmo quando ocorrem alterações anormais na expressão das moléculas apresentadoras.

[017] Em qualquer um dos cenários, os inibidores de TGFβ1 contexto-permissivos são vantajosamente destinados a visar as formas pró/Latentes de TGFβ1 em associação com várias moléculas apresentadoras, todas elas ou combinações diferentes delas que estão presentes em um microambiente(s) de doença. Mais especificamente, em uma modalidade, o inibidor visa TGFβ1 associado à ECM (complexos LTBP1/3-TGFβ1). Em outra modalidade, o inibidor visa TGFβ1 associado à célula imune. Isso inclui TGFβ1 apresentado por GARP, por

exemplo, complexos GARP-TGF β 1 expressos em células Treg e complexos LRRC33-TGF β 1 expressos em macrófagos e outras células mielóides/Linfóides, bem como certas células de câncer.

[018] Esses anticorpos incluem inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos que se ligam e evitam a ativação (ou liberação) de fator de crescimento TGF β 1 maduro por um complexo de TGF β 1 pró/Latente de uma forma contexto-permissiva (ou contexto-independente), de modo que os anticorpos possam inibir a ativação (ou liberação) de TGF β 1 associado com vários tipos de moléculas apresentadoras. Em particular, a presente invenção fornece anticorpos capazes de bloquear pelo menos um contexto de TGF β 1 associado à ECM (apresentado por LTBP e/ou apresentado por LTBP3) e pelo menos um contexto de TGF β 1 associado à célula (apresentado por GARP e/ou apresentado por LRRC33).

[019] Foram sugeridas várias condições de doença que envolvem a desregulação de sinalização de TGF β como um fator contribuinte. Na verdade, a patogênese e/ou progressão de certas condições humanas parecem ser predominantemente dirigidas ou dependente de atividades de TGF β 1. Em particular, muitas dessas doenças e distúrbios parecem envolver tanto um componente da ECM quanto um componente imune da função de TGF β 1, sugerindo que a ativação de TGF β 1 em múltiplos contextos (por exemplo, mediada por mais de um tipo de moléculas apresentadoras) esteja envolvida. Além disso, é contemplado que há uma comunicação cruzada entre células responsivas ao TGF β 1. Em alguns casos, a interconexão entre atividades multifacetadas do eixo de TGF β 1 pode levar à progressão, ao agravamento e/ou à supressão de doença da

habilidade do hospedeiro para combater a doença. Por exemplo, certos microambientes de doença, por exemplo, microambiente tumoral (TME), podem estar associados com TGF β 1 apresentado por várias moléculas apresentadoras diferentes, por exemplo, LTBP1-pró-TGF β 1, LTBP3-pró-TGF β 1, GARP-pró-TGF β 1, LRRC33-pró-TGF β 1, e quaisquer combinações destes. As atividades de TGF β 1 de um contexto podem, por sua vez, regular ou influenciar atividades de TGF β 1 de outro contexto, despertando a possibilidade de que, quando desreguladas, isso possa resultar na exacerbação de condições de doença. Portanto, é desejável inibir amplamente através de vários modos a função de TGF β 1 (ou seja, múltiplos contextos) limitando-se seletivamente, ao mesmo tempo, esses efeitos inibidores à isoforma TGF β 1. O objetivo é não perturbar a sinalização de TGF β homeostática mediada pelas outras isoformas, incluindo TGF β 3, que desempenha um papel importante na cicatrização de feridas.

[020] Para solucionar essa questão, os inventores da presente revelação buscaram gerar inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, que possam ser particularmente vantajosos para uso terapêutico no tratamento de doenças que são dirigidas ou dependentes da sinalização de TGF β 1 ou sua desregulação. A abordagem utilizada para atender aos critérios para esses inibidores é: i) a habilidade para inibir a sinalização de TGF β 1 de uma forma isoforma-específica (sem interferência com atividades de TGF β 2 e/ou TGF β 3); e, ii) a habilidade para inibir tanto a sinalização de um TGF β 1 associado à ECM quanto a sinalização de um TGF β 1 associado à célula imune. A lógica para essa abordagem é equilibrar a eficácia (e, portanto, a

eficácia clínica) da inibição de TGF β 1 contra toxicidades potenciais. Mais especificamente, a obtenção de seletividade em direção a TGF β 1 em dosagem terapêutica em relação às outras isoformas é visada para reduzir ou minimizar possíveis toxicidades (por exemplo, efeitos colaterais e eventos adversos indesejados) associadas à pan-inibição de TGF β *in vivo*, alguns dos quais podendo ser necessários para funções biológicas normais (por exemplo, cicatrização de feridas). Por outro lado, a inclusão de múltiplos contextos de TGF β 1 como alvo terapêutico visa assegurar ou otimizar a eficácia clínica em uma doença que envolve a desregulação de múltiplos aspectos da sinalização de TGF β 1. Várias modalidades de aplicações clínicas e regimes de tratamento são englobadas pela invenção.

[021] Consequentemente, em um aspecto, são fornecidos neste relatório descritivo inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, caracterizado pelo fato de que esses inibidores possuem a habilidade para inibir tanto a sinalização de um TGF β 1 associado à ECM quanto a sinalização de um TGF β 1 associado à célula imune. Especificamente, esses inibidores podem bloquear TGF β 1 apresentado em múltiplos contextos, ou seja, atividades de TGF β 1 mediadas por dois ou mais tipos de moléculas apresentadoras mantendo, ao mesmo tempo, as atividades de TGF β 2 e TGF β 3 intactas. Dessa forma, as atividades de TGF β 1 que podem ser inibidas por esses inibidores incluem duas ou mais das seguintes: i) sinalização de TGF β 1 associada com TGF β 1 apresentado por GARP; ii) sinalização de TGF β 1 associada com TGF β 1 apresentado por LRRC33; iii) sinalização de TGF β 1 associada com TGF β 1 apresentado por LTBP1; e, iv)

sinalização de TGF β 1 associada com TGF β 1 apresentado por LTBP3. Em algumas modalidades, esses inibidores visam pelo menos duas ou, pelo menos três das formas de pró-proteína dos seguintes complexos: i) TGF β 1-GARP; ii) TGF β 1-LRRC33; iii) TGF β 1-LTBP1; e, iv) TGF β 1-LTBP3. Em algumas modalidades, esses inibidores são anticorpos monoclonais que se ligam e inibem especificamente i) TGF β 1-GARP; iii) TGF β 1-LTBP1; e, iv) TGF β 1-LTBP3. Em algumas modalidades, esses anticorpos monoclonais se ligam e inibem especificamente ii) TGF β 1-LRRC33; iii) TGF β 1-LTBP1; e, iv) TGF β 1-LTBP3. Em algumas modalidades, esses anticorpos monoclonais se ligam e inibem especificamente i) TGF β 1-GARP; ii) TGF β 1-LRRC33; e iii) TGF β 1-LTBP1. Em algumas modalidades, esses anticorpos monoclonais se ligam e inibem especificamente i) TGF β 1-GARP; ii) TGF β 1-LRRC33; e iv) TGF β 1-LTBP3. Em algumas modalidades, esses anticorpos monoclonais inibem especificamente todos os seguintes complexos: i) TGF β 1-GARP; ii) TGF β 1-LRRC33; iii) TGF β 1-LTBP1; e, iv) TGF β 1-LTBP3. Em algumas modalidades, esses anticorpos monoclonais não se ligam ao TGF β 1 maduro que é TGF β 1 livre (por exemplo, fator de crescimento que é liberado por ou não complexado com uma molécula apresentadora). O aspecto da invenção inclui composições que compreendem um inibidor desse tipo incluindo, por exemplo, composições farmacêuticas que são adequadas para administração em indivíduos humanos e não humanos a serem tratados. Essas composições farmacêuticas são tipicamente estéreis. Em algumas modalidades, essas composições farmacêuticas também podem compreender pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável, por exemplo, um tampão e um tensoativo (por exemplo, polissorbatos). Kits

que compreendem uma composição farmacêutica desse tipo também estão englobados pela invenção.

[022] Os inibidores isoforma-específicos, contexto-permissivos, descritos nesse relatório descritivo são adequados para uso no tratamento de doença ou distúrbio que envolve múltiplas funções biológicas de TGF β 1 e sua desregulação. Em particular, essa doença ou distúrbio envolve tanto um componente da ECM da função de TGF β 1 quanto um componente imune da função de TGF β 1. A administração de um inibidor desse tipo pode, portanto, inibir cada eixo da via de sinalização de TGF β 1 *in vivo*, por exemplo, múltiplos alvos de TGF β 1 associados à doença ou distúrbio, aumentando os efeitos terapêuticos. Consequentemente, em outro aspecto, a invenção inclui o uso terapêutico desses inibidores em um método para o tratamento de um indivíduo que sofre de uma doença associada à desregulação de TGF β 1. Os inibidores da sinalização de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos ou contexto-independentes são particularmente adequados para o tratamento de uma doença que é dirigida ou dependente de múltiplas funções (por exemplo, tanto um componente da ECM quanto um componente imune) de TGF β 1. Tipicamente, essas doenças envolvem vários tipos de células ou estados de células nos quais TGF β 1 é apresentado com vários tipos de moléculas apresentadoras (por exemplo, múltiplos contextos).

[023] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece métodos de avaliação, produção e fabricação para inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, com um perfil de segurança aprimorado (por exemplo, toxicidade *in vivo* reduzida). Esses métodos exigem que os agentes

candidatos sejam testados e selecionados quanto à especificidade de isoforma TGF β 1, por exemplo, os agentes candidatos são selecionados quanto às atividades inibidoras contra a sinalização de TGF β 1, e não contra a sinalização de TGF β 2 e/ou TGF β 3. De acordo com a invenção, esses inibidores isoforma-específicos de atividades de TGF β 1 podem inibir múltiplos contextos da função de TGF β 1 (veja abaixo).

[024] Em algumas modalidades, esses agentes são anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno destes que se ligam e bloqueiam especificamente a ativação de TGF β 1, mas não a de TGF β 2 e/ou TGF β 3. Em algumas modalidades, esses anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno destes não se ligam ao fator de crescimento TGF β 1 maduro livre que não está associado com um complexo pró/Latente. Dessa forma, métodos de produção relevantes podem incluir uma etapa de avaliação na qual os agentes candidatos (por exemplo, anticorpos candidatos ou fragmentos destes) são avaliados quanto à sua habilidade para inibir TGF β 1 que está associado com moléculas apresentadoras particulares, por exemplo, GARP, LRRC33, LTBP1 e/ou LTBP3. Em algumas modalidades, complexo precursor inativo (por exemplo, latente), por exemplo, GARP-pró-TGF β 1, LRRC33-pró-TGF β 1, LTBP1-pró-TGF β 1 e LTBP3-pró-TGF β 1, pode ser utilizado para avaliar a ativação de fator de crescimento TGF β 1 ativo, maduro. A ativação de TGF β 1, na presença ou ausência de um agente de teste (ou seja, inibidor candidato) pode ser medida por qualquer meio adequado incluindo, sem limitação, ensaios *in vitro* e ensaios baseados em células. Uma etapa de avaliação similar pode ser utilizada para testar a especificidade de isoforma pelo uso de TGF β 2 e/ou TGF β 3 contrapartes. Essa etapa de avaliação

pode ser realizada para identificar agentes candidatos (por exemplo, anticorpos candidatos ou fragmentos destes) quanto à sua habilidade para inibir a sinalização de TGF β 1 em: i) uma forma isoforma-específica; e, ii) uma forma contexto-permissiva ou contexto-independente.

[025] Certas doenças estão associadas com desregulação de vários papéis biológicos da sinalização de TGF β que não estão limitados a um único contexto da função de TGF β . Nessas situações, pode ser benéfico modular os efeitos de TGF β através de múltiplos contextos envolvidos no surgimento e/ou durante a evolução da progressão de doença. Dessa forma, em algumas modalidades, a invenção fornece métodos para visar e inibir amplamente múltiplos contextos de TGF β 1, mas de uma forma isoforma-específica. Esses agentes são daqui por diante denominados nesse relatório descritivo inibidores de TGF β 1 "isoforma-específicos, contexto-permissivos". Dessa forma, inibidores de TGF β 1 contexto-permissivos visam múltiplos contextos (por exemplo, vários tipos de complexos de TGF β 1 pró/Latentes). De preferência, esses inibidores visam pelo menos um tipo (ou "contexto") de complexo de pré-ativação de TGF β 1 que está associado à ECM (ou seja, complexo de TGF β 1 pró/Latente apresentado por uma molécula apresentadora associada à ECM) e, adicionalmente, pelo menos um tipo (ou "contexto") de complexo de pré-ativação de TGF β 1 aderido à superfície da célula (ou seja, complexo de TGF β 1 pró/Latente apresentado por uma molécula apresentadora associada à célula ou membrana). Em algumas modalidades, moduladores de TGF β 1 contexto-permissivos visam todos os tipos de complexos de TGF β 1 pró/Latente (por exemplo, associados a GARP, associados a LRRC33, associados a LTBP

etc.), de modo a englobar todos os contextos independentemente da molécula (ou moléculas) apresentadora particular.

[026] Embora os inibidores de TGF β 1 contexto-permissivos sejam capazes de visar mais de um tipo de complexos de TGF β 1 pró/Latentes (ou seja, com moléculas apresentadoras diferentes), em algumas modalidades, esses inibidores podem favorecer (ou exibir uma tendência para) um ou mais contextos em relação a outro (ou outros). Dessa forma, em algumas modalidades, um anticorpo contexto-permissivo que inibe a ativação de TGF β 1 pode preferencialmente inibir a ativação de TGF β 1 mediada por uma molécula apresentadora em relação a outra molécula apresentadora, até mesmo se esse anticorpo é capaz de se ligar a ambos os tipos de complexos pró/Latentes. Em algumas modalidades, esse anticorpo é um anticorpo monoclonal que se liga e inibe a ativação de TGF β 1 associado a LTBP1/3, TGF β 1 associado a GARP e TGF β 1 associado a LRRC33, mas com atividades inibidoras preferenciais em direção a TGF β 1 associado a LTBP1/3. Em algumas modalidades, esse anticorpo é um anticorpo monoclonal que se liga e inibe a ativação de TGF β 1 associado a LTBP1, TGF β 1 associado a LTBP3, TGF β 1 associado a GARP e TGF β 1 associado a LRRC33, mas com atividades inibidoras preferenciais em direção a TGF β 1 associado a LTBP1 e LTBP-3. Em algumas modalidades, esse anticorpo é um anticorpo monoclonal que se liga e inibe a ativação de TGF β 1 associado a LTBP1, TGF β 1 associado a LTBP3, TGF β 1 associado a GARP e TGF β 1 associado a LRRC33, mas com atividades inibidoras preferenciais em direção a TGF β 1 associado a GARP e TGF β 1 associado a LRRC33. Em algumas modalidades, esse anticorpo é um anticorpo monoclonal que se

liga e inibe a ativação de TGF β 1 associado a GARP e TGF β 1 associado a LRRC33, mas com atividades inibidoras preferenciais em direção a TGF β 1 associado a GARP. Em algumas modalidades, esse anticorpo é um anticorpo monoclonal que se liga e inibe a ativação de TGF β 1 associado a GARP e TGF β 1 associado a LRRC33, mas com atividades inibidoras preferenciais em direção a TGF β 1 associado a LRRC33.

[027] Dessa forma, de acordo com a invenção, podem ser gerados graus variáveis de seletividade a fim de visar um subconjunto de efeitos de TGF β . Inibidores de isoforma de TGF β -específicos (que visam uma única isoforma de TGF β) fornecem seletividade maior do que os denominados pan-inibidores de TGF β (que visam várias ou todas as isoformas de TGF β).

[028] A invenção inclui o uso desses inibidores de TGF β 1 em métodos para o tratamento de uma doença associada à desregulação de TGF β 1. O uso desses inibidores é particularmente vantajoso em condições nas quais a isoforma TGF β 1 desempenha um papel dominante (em relação a TGF β 2/3) na direção da doença, e nas quais a doença envolve tanto um componente da ECM quanto um componente imune da sinalização de TGF β 1. Essa abordagem visa preservar funções normais ou homeostáticas de TGF β , enquanto visa preferencialmente a função de TGF β associada à doença.

[029] Esse inibidor é preferivelmente um inibidor da ativação de TGF β 1 (ou seja, inibidor da etapa de ativação de TGF β 1). Em modalidades preferidas, um inibidor desse tipo é capaz de visar as formas inativas de TGF β 1 (por exemplo, complexos de TGF β 1 pró/Latentes) antes da ativação para produzir uma inibição mais durável, comparado com quando se

visa uma forma solúvel/Livre transitória, já ativada, do fator de crescimento que foi liberada pelo complexo latente. A determinação da fonte/contexto de TGF β 1 associado à doença pode ser realizada com o uso de anticorpos que se ligam especificamente um complexo latente de TGF β 1 que inclui uma molécula apresentadora de interesse particular (por exemplo, GARP, LRRC33, LTBP1, LTBP3 etc.).

[030] Aspectos da presente revelação estão relacionados às imunoglobulinas, por exemplo, anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, que se ligam especificamente a pelo menos três dos seguintes complexos: um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e um complexo LRRC33-TGF β 1. De acordo com a invenção, essas imunoglobulinas se ligam especificamente a pelo menos um tipo de complexo de TGF β 1 associado à ECM (por exemplo, aderidos à ECM) (por exemplo, complexos de TGF β 1 associados a LTBP1 e/ou LTBP3) e pelo menos um tipo de complexo de TGF β 1 associado à célula (por exemplo, aderido à superfície da célula) (por exemplo, complexos de TGF β 1 associados a GARP e/ou LRRC33) para efetuar uma ação inibidora ampla em múltiplos contextos. Os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, descritos nesse relatório descritivo, se ligam especificamente a um epítipo de TGF β 1 (por exemplo, LAP) ou um componente (ou componentes) de um complexo de proteína que compreende o TGF β 1 (por exemplo, LAP), que está disponível para ligação pelos anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, quando o TGF β 1 está presente em um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1.

[031] Em algumas modalidades, o epítipo está disponível

para ligação pelo anticorpo quando o TGF β 1 está presente em dois ou mais dos seguintes complexos de proteína: um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e um complexo LRRC33-TGF β 1; e em que o anticorpo não se liga ao fator de crescimento TGF β 1 maduro livre que não está em associação com o complexo pró/Latente.

[032] Em algumas modalidades, o TGF β 1 é pró-TGF β 1 e/ou TGF β 1 latente (por exemplo, TGF β 1 pró/Latente). Em algumas modalidades, o TGF β 1 é TGF β 1 latente. Em algumas modalidades, o TGF β 1 é pró-TGF β 1.

[033] Os inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos de acordo com a invenção não se ligam a TGF β 2. Os inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos de acordo com a invenção não se ligam a TGF β 3. Em algumas modalidades, esses inibidores não se ligam a TGF β 2 pró/Latente. Em algumas modalidades, esses inibidores não se ligam a TGF β 3 pró/Latente. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, não impede a habilidade de TGF β 1 para se ligar à integrina.

[034] Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende uma CDR3 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 87 e uma região variável da cadeia leve que compreende uma CDR3 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 90. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende uma CDR2 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 86 e uma região variável da cadeia leve que compreende uma CDR2 que possui a sequência de aminoácidos do

ID. DE SEQ. N°: 89. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende uma CDR1 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 85 e uma região variável da cadeia leve que compreende uma CDR1 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 88.

[035] Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma sequência de polipeptídeos da cadeia pesada que é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 99. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma sequência de polipeptídeos da cadeia leve que é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 100. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma sequência de polipeptídeos da cadeia pesada que é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 99 e uma sequência de polipeptídeos da cadeia leve que é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 100. Em algumas modalidades, esse anticorpo compreende CDRs como apresentadas nos IDS. DE SEQ. N°s: 85-90. Em algumas modalidades, o anticorpo consiste em dois polipeptídeos do ID. DE SEQ. N°: 99 e dois polipeptídeos do ID. DE SEQ. N°: 100.

[036] Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende um domínio variável da cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade para a sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 95 e um domínio variável da cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos que

possui pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade para a sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 97.

[037] Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende um domínio variável da cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 95 e um domínio variável da cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 97.

[038] Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, inibe a ativação de TGF β 1, mas não a ativação de TGF β 2 ou a ativação de TGF β 3.

[039] Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, inibe a liberação de TGF β 1 maduro pelo complexo GARP-TGF β 1, pelo complexo LTBP1-TGF β 1, pelo complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou pelo complexo LRRC33-TGF β 1.

[040] Em um aspecto, é fornecida neste relatório descritivo uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, como descrito nesse relatório descritivo, e um carreador farmacêuticamente aceitável. Essas composições farmacêuticas são tipicamente estéreis e são adequadas para administração em seres humanos. Em algumas modalidades, essas composições farmacêuticas podem ser fornecidas como kits, que são englobados pela invenção.

[041] Em outro aspecto, é fornecido neste relatório descritivo um método para inibição da ativação de TGF β 1, o método compreendendo a exposição de um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 ou um complexo LRRC33-TGF β 1 a um anticorpo, uma porção de ligação

ao antígeno deste, ou uma composição farmacêutica descrita nesse relatório descritivo.

[042] Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, inibe a liberação de TGF β 1 maduro pelo complexo GARP-TGF β 1, pelo complexo LTBP1-TGF β 1, por um complexo LTBP3-TGF β 1 ou pelo complexo LRRC33-TGF β 1.

[043] Em algumas modalidades, o método é realizado *in vitro*. Em algumas modalidades, o método é realizado *in vivo*.

[044] Dessa forma, a invenção inclui um método para o tratamento de uma doença associada à desregulação da sinalização de TGF β 1 em um indivíduo humano. Esse método compreende uma etapa de: administração a um indivíduo humano necessitado de uma composição farmacêutica fornecida neste relatório descritivo, em uma quantidade eficaz para tratar a doença, em que a quantidade obtém eficácia clínica e segurança estatisticamente significantes quando administrada a uma população de pacientes que possuem a doença.

[045] Ainda em outro aspecto, é fornecido neste relatório descritivo um inibidor de TGF β para uso na redução de efeitos adversos em um indivíduo, em que o inibidor de TGF β é isoforma-seletivo. Em algumas modalidades, o inibidor de TGF β é um anticorpo que inibe especificamente TGF β 1, ao mesmo tempo em que visa amplamente múltiplos contextos.

[046] Em algumas modalidades, a célula que expressa o complexo GARP-TGF β 1 ou o complexo LRRC33-TGF β 1 é uma célula T, um fibroblasto, um miofibroblasto, um macrófago, um monócito, uma célula dendrítica, uma célula apresentadora de antígeno, um neutrófilo, uma célula supressora de derivação mielóide (MDSC), um linfócito, um mastócito, um megacariócito, uma célula *natural killer* (NK), uma

microglia, ou uma célula progenitora de qualquer uma dessas células. Em algumas modalidades, a célula que expressa o complexo GARP-TGF β 1 ou o complexo LRRC33-TGF β 1 é uma célula-tronco hematopoiética. Em algumas modalidades, a célula que expressa o complexo GARP-TGF β 1 ou o complexo LRRC33-TGF β 1 é uma célula derivada da crista neural. A célula T pode ser uma célula T regulatória (por exemplo, célula T imunossupressora). A célula T pode ser uma célula T CD4-positiva (CD4+) e/ou uma célula T CD8-positiva (CD8+). O neutrófilo pode ser um neutrófilo ativado. O macrófago pode ser um macrófago polarizado, incluindo macrófagos pró-fibróticos e/ou associados a tumores (TAM), por exemplo, macrófagos do subtipo M2c e do subtipo M2d. O macrófago pode ser ativado por um ou mais fatores solúveis, por exemplo, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e/ou outras moléculas que estão presentes em um microambiente de doença particular (por exemplo, TME), que podem funcionar de forma autócrina, parácrina e/ou endócrina. Em algumas modalidades, o macrófago é ativado por M-CSF, por exemplo, M-CSF secretado por um tumor sólido. Em algumas modalidades, o macrófago é ativado por TGF β 1.

[047] Em algumas modalidades, a célula que expressa o complexo GARP-TGF β 1 ou o complexo LRRC33-TGF β 1 é uma célula de câncer, por exemplo, células de câncer e células tumorais circulantes. Em algumas modalidades, a célula que expressa o complexo GARP-TGF β 1 ou o complexo LRRC33-TGF β 1 é recrutada para um local de doença, por exemplo, TME (por exemplo, infiltrado tumoral). Em algumas modalidades, a expressão do complexo GARP-TGF β 1 ou do complexo LRRC33-TGF β 1 é induzida por um microambiente de doença (por exemplo, TME). Em algumas

modalidades, um tumor sólido compreende infiltrados de leucócitos elevados, por exemplo, CD45+. É contemplado que células CD45+ associadas ao tumor incluem células que expressam GARP e/ou que expressam LRRC33.

[048] Em algumas modalidades, o complexo LTBP1-TGF β 1 ou o complexo LTBP3-TGF β 1 está ligado a uma matriz extracelular (ou seja, componentes da ECM). Em algumas modalidades, a matriz extracelular compreende fibrilina e/ou fibronectina. Em algumas modalidades, a matriz extracelular compreende uma proteína que compreende um motivo RGD. Em algumas modalidades, células que produzem e depositam o complexo LTBP1-TGF β 1 ou o complexo LTBP3-TGF β 1 estão presentes em um tumor sólido, por exemplo, células de câncer e células estromais. Em algumas modalidades, células que produzem e depositam o complexo LTBP1-TGF β 1 ou o complexo LTBP3-TGF β 1 estão presentes em um tecido fibrótico. Em algumas modalidades, células que produzem e depositam o complexo LTBP1-TGF β 1 ou o complexo LTBP3-TGF β 1 estão presentes em uma medula óssea. Em algumas modalidades, células que produzem e depositam o complexo LTBP1-TGF β 1 ou o complexo LTBP3-TGF β 1 são miofibroblastos ou células miofibroblasto-like incluindo, por exemplo, fibroblastos associados ao câncer (CAFs).

[049] Em outro aspecto, é fornecido neste relatório descritivo um método para redução da ativação de TGF β 1 em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo, uma porção de ligação ao antígeno deste, ou uma composição farmacêutica, como descrita nesse relatório descritivo reduzindo, dessa forma, a ativação de TGF β 1 no indivíduo.

[050] Em algumas modalidades, o indivíduo possui ou está em risco de ter um distúrbio fibrótico. Em algumas modalidades, o distúrbio fibrótico compreende inflamação crônica do tecido/órgão afetado. Em algumas modalidades, o indivíduo possui uma distrofia muscular. Em algumas modalidades, o indivíduo possui distrofia muscular de Duchenne (DMD). Em algumas modalidades, o indivíduo possui ou está em risco de ter fibrose hepática, fibrose renal, fibrose pulmonar (por exemplo, fibrose pulmonar idiopática), endometriose ou fibrose uterina. Em algumas modalidades, o indivíduo possui ou está em risco de ter câncer (por exemplo, tumor sólido, câncer sanguíneo e mielofibrose). Em algumas modalidades, o indivíduo possui ou está em risco de ter demência.

[051] Em algumas modalidades, o indivíduo ainda recebe uma terapia adicional. Em algumas modalidades, a terapia adicional é selecionada do grupo que consiste em um inibidor de miostatina, um agonista de VEGF, um agonista de IGF1, um agonista de FXR, um inibidor de CCR2, um inibidor de CCR5, um inibidor duplo de CCR2/CCR5, um inibidor de lisil oxidase-like-2, um inibidor de ASK1, um inibidor de Acetil-CoA Carboxilase (ACC), um inibidor de p38 quinase, Pirfenidona, Nintedanib, um inibidor de GDF11, inibidor de JAK (por exemplo, inibidor de JAK2), ou qualquer combinação destes.

[052] Em algumas modalidades, o anticorpo, ou a porção de ligação ao antígeno deste, reduz a atividade supressora de células T regulatórias (Tregs).

[053] Em algumas modalidades, o anticorpo, ou a porção de ligação ao antígeno deste, não induz toxicidade aos órgãos no indivíduo. Em algumas modalidades, a toxicidade aos órgãos

compreende toxicidade cardiovascular, toxicidade gastrintestinal, imunotoxicidade, toxicidade óssea, toxicidade à cartilagem, toxicidade ao reprodutivo sistema ou toxicidade renal.

[054] Em um aspecto, é fornecido neste relatório descritivo um método para o tratamento de câncer em um indivíduo necessitado, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo, uma porção de ligação ao antígeno deste, ou uma composição farmacêutica, como descrita nesse relatório descritivo tratando, desse modo, o câncer no indivíduo.

[055] Em outro aspecto, é fornecido neste relatório descritivo um método de redução do crescimento tumoral em um indivíduo necessitado, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo, uma porção de ligação ao antígeno deste, ou uma composição farmacêutica, como descrita nesse relatório descritivo reduzindo, dessa forma, o crescimento tumoral no indivíduo.

[056] Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, é administrado em combinação com um agente adicional ou uma terapia adicional. Em algumas modalidades, o agente adicional é um inibidor de *checkpoint*. Em algumas modalidades, o agente adicional é selecionado do grupo que consiste em um antagonista de PD-1, um antagonista de PDL1, uma proteína de fusão de PD-L1 ou PDL2, um antagonista de CTLA4 etc. Essas terapias combinadas podem utilizar vantajosamente dosagens menores dos agentes terapêuticos administrados evitando, dessa forma, possíveis toxicidades ou complicações associadas com as várias

monoterapias ou terapias combinadas convencionais que não possuem o grau de seletividade/especificidade obtido pela presente invenção.

[057] Em algumas modalidades, o método ainda compreende a determinação (por exemplo, testagem ou confirmação) do envolvimento de TGF β 1 na doença, em relação a TGF β 2 e TGF β 3. Em algumas modalidades, o método ainda compreende uma etapa de: identificação de uma fonte (ou contexto) de TGF β 1 associada à doença. Em algumas modalidades, a fonte/contexto é avaliada por determinação da expressão de moléculas apresentadoras de TGF β , por exemplo, LTBP1, LTBP3, GARP e LRRC33 em uma amostra clínica retirada de pacientes.

[058] Ainda em outro aspecto, é fornecido neste relatório descritivo um método para a criação (por exemplo, produção, fabricação) de uma composição farmacêutica para inibição da sinalização de TGF β , o método compreendendo as etapas de: fornecimento de um ou mais agentes que inibem a sinalização de pelo menos uma isoforma de TGF β ; medição das atividades dos (um ou mais) agentes em direção a todas as isoformas de TGF β ; seleção de um agente que é seletivo para TGF β 1; formulação em uma composição farmacêutica que compreende um inibidor de TGF β 1 isoforma-específico e um excipiente farmacêuticamente aceitável, por exemplo, um tampão adequado. Também é fornecida uma composição farmacêutica produzida por esse método. Em algumas modalidades, o método ainda compreende uma etapa de determinação (por exemplo, medição, avaliação) das atividades inibidoras contexto-dependentes de um ou mais agentes.

[059] O assunto da presente revelação também está relacionado àquele de PCT/US2013/068613, depositado em 6 de

novembro de 2013; PCT/US2014/036933, depositado em 6 de maio de 2014; e PCT/US2017/021972, depositado em 10 de março de 2017, cujos conteúdos são incorporados nesse relatório descritivo por referência.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[060] A **FIG. 1** fornece uma representação esquemática que retrata TGF β 1 dentro de um complexo latente no microambiente do tecido.

[061] As **FIGS. 2A-2C** ilustram múltiplos contextos da função de TGF β 1: TGF β 1 apresentado por GARP é expresso em células T regulatórias, que está envolvido na regulação imune (FIG. 2A); TGF β 1 apresentado por LTBP1/3 é depositado por fibroblastos e outras células na ECM (FIG. 2B); e, TGF β 1 apresentado por LRRC33 é expresso em células mielóides, incluindo macrófagos (FIG. 2C).

[062] A **FIG. 3** ilustra uma plataforma de expressão de proteína para a produção de um complexo GARP-TGF β 1 e um complexo LTBP-TGF β 1. O sistema de expressão baseado em HEK293 usa Ni- purificação por afinidade em NTA e filtração em gel para obter quantidades multimiligramas de proteína purificada. São mostradas representações esquemáticas de pró-TGF β 1 do tipo selvagem, LTPB1, sGARP e pró-TGF β 1 C4S.

[063] A **FIG. 4A** retrata a ligação específica de Ab3 ao TGF β 1 latente. A FIG. 4B mostra a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais exemplares. A FIG. 4B retrata que Ab1 e Ab2 se ligam especificamente ao pró-TGF β 1, como medido por ELISA, mas não pró-TGF β 2, pró-TGF β 3 ou TGF β 1 maduro. A FIG. 4C retrata um exemplo de um anticorpo que se liga (como medido por ELISA) especificamente ao complexo LTBP1-pró-TGF β 1.

[064] A **FIG. 5** fornece um painel de anticorpos da técnica estabelecida feitos contra fator de crescimento TGF β maduro, e seus respectivos perfis de ligação para todas as três isoformas.

[065] As **FIGS. 6A-6B** fornecem perfis de ligação, como medidos por Octet, de Ab1, Ab2 e Ab3, que são inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos/independentes.

[066] As **FIGS. 7A-7H** fornecem ensaios de inibição baseados em células.

[067] A **FIG. 8** mostra os efeitos inibidores de Ab3 sobre a ativação de TGF β 1 induzida por calicreína *in vitro*.

[068] As **FIGS. 9A-9B** mostram efeitos inibidores de Ab1 e Ab3 sobre a supressão célula T regulatória-dependente da proliferação de células T efectoras.

[069] As **FIGS. 10A-10C** mostram a supra-regulação de superfície da expressão de célula LRRC33 em macrófagos polarizados.

[070] A **FIG. 11** fornece resultados de um modelo de colite por co-transferência de célula T.

[071] As **FIGS. 12A-12K** mostram efeitos inibidores de Ab2 sobre o modelo mecanístico de doença TGF β 1-dependente de UUO.

[072] As **FIGS. 13A-13C** mostram os efeitos inibidores de Ab3 sobre o modelo mecanístico de doença TGF β 1-dependente de UUO.

[073] A **FIG. 14** fornece efeitos inibidores de Ab3 sobre modelo de fibrose induzida por tetracloreto de carbono.

[074] A **FIG. 15** fornece efeitos inibidores de Ab3 sobre um modelo translacional de fibrose em camundongos Alport.

[075] A **FIG. 16** mostra efeitos inibidores de Ab2 sobre o crescimento tumoral em carcinoma MC38.

[076] A **FIG. 17** fornece efeitos de Ab3 em combinação com um antagonista de PD-1 sobre a sobrevida no modelo de tumor EMT-6.

[077] As **FIGS. 18A-18F** fornecem dados de toxicologia/tolerabilidade que mostram perfis de segurança aprimorados de Ab2 em ratos.

[078] As **FIGS. 19A-19B** fornecem dados de toxicologia/tolerabilidade que mostram perfis de segurança aprimorados de Ab3 em ratos.

[079] A **FIG. 20** fornece dados que mostram seletividade de isoforma *in vivo* de Ab3 em células de BAL homeostáticas de rato.

[080] As **FIGS. 21A-21D** fornecem a expressão relativa de isoformas de TGF β . A FIG. 21A mostra a expressão de isoforma de TGF β vs. comparador normal (por tipo de câncer). A FIG. 21B mostra a frequência de expressão de isoforma de TGF β por tipo de câncer humano. A FIG. 21C mostra a expressão de isoforma de TGF β em amostras de tumor individuais, por tipo de câncer. A FIG. 21D mostra a expressão de isoforma de TGF β linhagens de modelo de células de câncer em camundongo singênico.

[081] A **FIG. 22** retrata achados microscópicos no coração de um pan-anticorpo de TGF β de um estudo de 1 semana.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE CERTAS MODALIDADES

[082] Em mamíferos, a superfamília do fator de transformação de crescimento-beta (TGF β) é composta por pelo menos 33 produtos gênicos. Esses incluem as proteínas morfogênicas ósseas (BMPs), activinas, fatores de

crescimento e diferenciação (GDFs), e as três isoformas da família TGF β : TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3. Acredita-se que os TGF β s desempenhem papéis cruciais em diversos processos, por exemplo, inibição da proliferação celular, remodelagem da matriz extracelular (ECM) e homeostasia imune. A importância de TGF β 1 para a homeostasia da célula T é demonstrada pela observação de que camundongos TGF β 1-/- só sobrevivem 3-4 semanas, sucumbindo à insuficiência de múltiplos órgãos em consequência de ativação imune maciça (Kulkarni, A.B., e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993. 90 (2): páginas 770-4; Shull, M.M., e cols., *Nature*, 1992. 359 (6397): páginas 693-9). Os papéis de TGF β 2 e TGF β 3 são menos nítidos. Embora as três isoformas de TGF β tenham padrões de expressão temporal e espacial distintos, elas sinalizam por meio dos mesmos receptores, TGF β RI e TGF β RII, embora, em alguns casos, por exemplo, para a sinalização de TGF β 2, receptores do tipo III como, por exemplo, beta-glicano, também sejam necessários (Feng, X.H. e R. Derynck, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2005. 21: páginas 659-93; Massague, J., *Annu. Rev. Biochem.*, 1998. 67: páginas 753-91). A oligomerização de TGF β RI/II induzida por ligante desencadeia a fosforilação de fatores de transcrição SMAD, resultando na transcrição de genes-alvo como, por exemplo, *Colla1*, *Col3a1*, *ACTA2* e *SERPINE1* (Massague, J., J. Seoane, e D. Wotton, *Genes Dev.*, 2005. 19 (23): páginas 2.783-810). Vias de sinalização de TGF β SMAD-independente também foram descritas, por exemplo, no câncer ou nas lesões aórticas de camundongos com Marfan (Derynck, R. e Y.E. Zhang, *Nature*, 2003. 425 (6958): páginas 577-84; Holm, T.M., e cols., *Science*, 2011. 332 (6027): páginas 358-61).

[083] A importância biológica da via de TGF β em humanos foi validada por doenças genéticas. A doença de Camurati-Engelman resulta em displasia óssea em consequência de uma mutação autossômica dominante no gene de TGFB1, levando à ativação constitutiva da sinalização de TGF β 1 (Janssens, K., e cols., *J. Med. Genet.*, 2006. 43 (1): páginas 1-11). Pacientes com síndrome de Loeys/Dietz carregam mutações autossômicas dominantes em componentes da via de sinalização de TGF β , que causam aneurisma aórtico, hipertelorismo e úvula bífida (Van Laer, L., H. Dietz, e B. Loeys, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2014. 802: páginas 95-105). Como a desregulação da via de TGF β foi implicada em várias doenças, vários fármacos que visam a via de TGF β foram desenvolvidos e testados em pacientes, mas com sucesso limitado.

[084] A desregulação da sinalização de TGF β foi associada a uma ampla gama de doenças humanas. Na verdade, em diversas condições de doença, essa desregulação pode envolver várias facetas da função de TGF β . Tecido doente, por exemplo, tecidos e tumores fibróticos e/ou inflamados, podem criar um ambiente local no qual a ativação de TGF β pode causar exacerbação ou progressão da doença, que é, pelo menos em parte, mediada por interações entre várias células responsivas ao TGF β , que são ativadas de uma forma autócrina e/ou parácrina, junto com várias outras citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que desempenham um papel em um quadro de doença particular. Por exemplo, um microambiente tumoral (TME) contém vários tipos de células que expressam TGF β 1, por exemplo, fibroblastos miofibroblasto-*like* ativados, células estromais, macrófagos infiltrantes, MDSCs e outras células imunes, além de células

de câncer (ou seja, malignas). Dessa forma, o TME representa uma população heterogênea de células que expressam e/ou respondem ao TGF β 1, mas em associação com mais de um tipo de moléculas apresentadoras, por exemplo, LTBP1, LTBP3, LRRC33 e GARP, dentro do nicho.

[085] Para inibir eficazmente atividades de TGF β 1 desreguladas ou que conduzem à doença que envolvem vários tipos de células e "contextos" de sinalização, os inventores da presente revelação buscaram desenvolver uma classe de agentes que possui a habilidade para inibir múltiplas funções de TGF β 1, mas de uma forma isoforma-específica. Esses agentes são referidos como inibidores de TGF β 1 "isoforma-específicos, contexto-permissivos", como definidos nesse relatório descritivo. Em algumas modalidades, esses inibidores são inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-independentes. É contemplado que o uso de um inibidor de TGF β 1 isoforma-específico, contexto-permissivo ou contexto-independente, pode exercer seus efeitos inibidores mediante vários modos da função de TGF β 1 em doenças que envolvem uma interação de vários tipos de células que expressam e/ou respondem à sinalização de TGF β 1 aumentando, dessa forma, os efeitos terapêuticos ao visar vários tipos de complexos precursores de TGF β 1. Consequentemente, os alvos terapêuticos de um inibidor desse tipo incluem pelo menos três dos seguintes complexos: i) pró-TGF β 1 apresentado por GARP; ii) pró-TGF β 1 apresentado por LRRC33; iii) pró-TGF β 1 apresentado por LTBP1; e iv) pró-TGF β 1 apresentado por LTBP3. Tipicamente, os complexos (i) e (ii) acima estão presentes na superfície da célula, pois tanto GARP quanto LRRC33 são proteínas transmembrana capazes

de apresentar TGF β 1 na face extracelular, enquanto os complexos (iii) e (iv) são componentes da matriz extracelular. Vários estudos esclareceram os mecanismos de ativação de TGF β 1. Foi demonstrado que três integrinas, α V β 6, α V β 8 e α V β 1, são ativadores cruciais de TGF β 1 latente (Reed, N.I., e cols., *Sci. Transl. Med.*, 2015. 7 (288): páginas 288ra79; Travis, M.A. e D. Sheppard, *Annu. Rev. Immunol.*, 2014. 32: páginas 51-82; Munger, J.S., e cols., *Cell*, 1999. 96 (3): páginas 319-28). As integrinas α V se ligam à sequência RGD presente em LAPs de TGF β 1 e TGF β 1 com alta afinidade (Dong, X., e cols., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2014. 21 (12): páginas 1.091-6). Camundongos transgênicos com uma mutação no sítio de RGD de TGF β 1 que evita a ligação de integrina, mas não a secreção, são uma fenocópia do camundongo TGF β 1-/- (Yang, Z., e cols., *J. Cell. Biol.*, 2007. 176 (6): páginas 787-93). Camundongos que não possuem as integrinas β 6 e β 8 recapitulam todos os fenótipos essenciais de camundongos com *knockout* de TGF β 1 e TGF β 3, incluindo inflamação multiórgãos e fenda palatina, confirmando o papel essencial dessas duas integrinas para ativação de TGF β 1 no desenvolvimento e homeostasia (Aluwihare, P., e cols., *J. Cell. Sci.*, 2009. 122 (Parte 2): páginas 227-32). Crucial para a ativação de TGF β 1 latente integrina-dependente é a adesão covalente às moléculas apresentadoras; a ruptura das ligações dissulfeto entre LAP de GARP e TGF β 1 por mutagênese não prejudica a formação de complexo, mas abole completamente a ativação de TGF β 1 por α V β 6 (Wang, R., e cols., *Mol. Biol. Cell.*, 2012. 23 (6): páginas 1.129-39). A estrutura recente de TGF β 1 latente ilumina como as integrinas habilitam a liberação de TGF β 1 ativo pelo complexo latente: a ligação

covalente de TGF β 1 latente à sua molécula apresentadora ancora TGF β 1 latente à ECM por meio de LTBP, ou ao citoesqueleto por meio de GARP ou LRRC33. A ligação de integrina à sequência RGD resulta em uma alteração força-dependente na estrutura de LAP, permitindo que TGF β 1 ativo seja liberado e se ligue aos receptores próximos (Shi, M., e cols., *Nature*, 2011. 474 (7351): páginas 343-9). A importância da ativação de TGF β 1 integrina-dependente na doença também foi bem validada. Um inibidor de α V β 1 de pequena molécula protege contra fibrose pulmonar induzida por bleomicina e fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono (Reed, N.I., e cols., *Sci. Transl. Med.*, 2015. 7 (288): páginas 288ra79), e o bloqueio de α V β 6 com um anticorpo ou a perda da expressão de integrina β 6 suprime a fibrose pulmonar induzida por bleomicina e a fibrose induzida por radiação (Munger, J.S., e cols., *Cell*, 1999. 96 (3): páginas 319-28); Horan, G.S., e cols., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2008. 177 (1): páginas 56-65). Além das integrinas, outros mecanismos de ativação de TGF β 1 foram implicados, incluindo trombospondina-1 e ativação por proteases como, por exemplo, metaloproteinases da matriz (MMPs), catepsina D ou calicreína. No entanto, a maioria desses estudos foi realizada *in vitro* usando proteínas purificadas; há menos evidências para o papel dessas moléculas por estudos *in vivo*. O *knockout* de trombospondina-1 recapitula alguns aspectos do fenótipo TGF β 1-/- em alguns tecidos, mas não é protetor na fibrose pulmonar induzida por bleomicina, sabidamente TGF β -dependente (Ezzie, M.E., e cols., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2011. 44 (4): páginas 556-61). Adicionalmente, o *knockout* de proteases candidatas

não resultou em um fenótipo de TGF β 1 (Worthington, J.J., J.E. Klementowicz, e M.A. Travis, *Trends Biochem. Sci.*, 2011. 36 (1): páginas 47-54). Isso poderia ser explicado por redundâncias ou por esses mecanismos serem cruciais em doenças específicas, e não no desenvolvimento e homeostasia.

[086] Dessa forma, os inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, descritos nesse relatório descritivo incluem inibidores que funcionam por prevenção da etapa de ativação de TGF β 1. Em algumas modalidades, esses inibidores podem inibir a ativação de TGF β 1 integrina-dependente (por exemplo, mecânica ou dirigida por força) (veja a FIG. 2). Em algumas modalidades, esses inibidores podem inibir a ativação de TGF β 1 protease-dependente ou induzida por protease. Os últimos incluem inibidores que inibem a etapa de ativação de TGF β 1 de uma forma integrina-independente. Em algumas modalidades, esses inibidores podem inibir a ativação de TGF β 1 independentemente do modo de ativação, por exemplo, inibem tanto a ativação integrina-dependente quanto a ativação protease-dependente de TGF β 1. Exemplos não limitantes de proteases que podem ativar TGF β 1 incluem serina proteases, por exemplo, Calicreínas, Quimotripsina, Tripsina, Elastases, Plasmina, bem como metaloproteases de zinco (família MMP), por exemplo, MMP-2, MMP-9 e MMP-13. Calicreínas incluem Calicreínas plasmáticas e Calicreínas teciduais, por exemplo, KLK1, KLK2, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK9, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13, KLK14 e KLK15. A FIG. 8 fornece um exemplo de um inibidor de TGF β 1 isoforma-específico, contexto-independente, que pode inibir a ativação de TGF β 1 Calicreína-dependente *in vitro*. Em algumas modalidades, os inibidores da presente invenção

evitam a liberação ou dissociação de fator de crescimento TGF β 1 ativo (maduro) pelo complexo latente. Em algumas modalidades, esses inibidores podem funcionar por estabilização da conformação inativa (por exemplo, latente) do complexo.

[087] TGF β foi implicado em diversos processos biológicos, incluindo fibrose, imunomodulação e progressão de câncer. TGF β 1 foi o primeiro membro identificado da superfamília TGF β de proteínas. Como outros membros da superfamília TGF β , TGF β 1 e as isoformas TGF β 2 e TGF β 3, são inicialmente expressas como formas precursoras inativas de pró-proteína (denominada pró-TGF β). As proteínas TGF β (por exemplo, TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3) são clivadas proteoliticamente por pró-proteína convertases (por exemplo, furina) para gerar a forma latente (denominada TGF β latente). Em algumas modalidades, uma forma de pró-proteína ou forma latente de uma proteína TGF β (por exemplo, TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3) pode ser referida como uma "proteína TGF β pró/Latente". TGF β 1 pode ser apresentado a outras moléculas em complexo com várias moléculas incluindo, por exemplo, GARP (para formar um complexo GARP-TGF β 1), LRRC33 (para formar um complexo LRRC33-TGF β 1), LTBP1 (para formar um complexo LTBP1-TGF β 1), e/ou LTBP3 (para formar um complexo LTBP3-TGF β 1). O TGF β 1 presente nesses complexos pode estar em forma latente (TGF β 1 latente) ou em forma precursora (pró-TGF β 1).

[088] A invenção é particularmente útil para uso terapêutico para certas doenças que estão associadas com vários papéis biológicos da sinalização de TGF β 1 que não estão limitados a um único contexto da função de TGF β 1.

Nessas situações, pode ser benéfico inibir os efeitos de TGF β 1 através de múltiplos contextos. Dessa forma, em algumas modalidades, a invenção fornece métodos para visar e inibir TGF β 1 de uma forma isoforma-específica, ao invés de uma forma contexto-específica. Esses agentes podem ser referidos como moduladores de TGF β 1 "isoforma-específicos, contexto-permissivos". Em algumas modalidades, moduladores de TGF β 1 contexto-permissivos visam múltiplos contextos (por exemplo, vários tipos de complexos de TGF β 1 pró/Latentes). Em algumas modalidades, moduladores de TGF β 1 contexto-permissivos visam todos os tipos de complexos de TGF β 1 pró/Latente (por exemplo, associados a GARP, associados a LRRC33, associados a LTBP etc.) de modo a englobar todos os contextos.

[089] Embora inibidores de TGF β 1 contexto-permissivos sejam capazes de visar mais de um tipo de complexos de TGF β 1 pró/Latentes (ou seja, com moléculas apresentadoras diferentes), em algumas modalidades, esses inibidores podem favorecer um ou mais contextos em relação aos outros. Dessa forma, em algumas modalidades, um anticorpo contexto-permissivo que inibe a ativação de TGF β 1 pode inibir preferencialmente a ativação de TGF β 1 mediada por uma molécula apresentadora em relação a outra molécula apresentadora, até mesmo se esse anticorpo é capaz de se ligar a ambos os tipos de complexos pró/Latentes. Em algumas modalidades, esse anticorpo é um anticorpo monoclonal que se liga e inibe a ativação de TGF β 1 associado a LTBP, TGF β 1 associado a GARP e TGF β 1 associado a LRRC33, mas com atividades inibidoras preferenciais em direção a TGF β 1 associado a LTBP. Em algumas modalidades, esse anticorpo é um anticorpo monoclonal que se liga e inibe a ativação de

TGF β 1 associado a LTBP1, TGF β 1 associado a LTBP3, TGF β 1 associado a GARP e TGF β 1 associado a LRRC33, mas com atividades inibidoras preferenciais em direção a TGF β 1 associado a LTBP1 e LTBP-3. Em algumas modalidades, esse anticorpo é um anticorpo monoclonal que se liga e inibe a ativação de TGF β 1 associado a LTBP1, TGF β 1 associado a LTBP3, TGF β 1 associado a GARP e TGF β 1 associado a LRRC33, mas com atividades inibidoras preferenciais em direção a TGF β 1 associado a GARP e TGF β 1 associado a LRRC33. Em algumas modalidades, esse anticorpo é um anticorpo monoclonal que se liga e inibe a ativação de TGF β 1 associado a GARP e TGF β 1 associado a LRRC33, mas com atividades inibidoras preferenciais em direção a TGF β 1 associado a GARP. Em algumas modalidades, esse anticorpo é um anticorpo monoclonal que se liga e inibe a ativação de TGF β 1 associado a GARP e TGF β 1 associado a LRRC33, mas com atividades inibidoras preferenciais em direção a TGF β 1 associado a LRRC33.

[090] Dessa forma, de acordo com a invenção, podem ser gerados graus variáveis de seletividade a fim de visar subconjunto de efeitos de TGF β . Inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos (que visam uma única isoforma de TGF β , por exemplo, TGF β 1) fornecem seletividade maior do que pan-inibidores de TGF β (que visam várias ou todas as isoformas de TGF β). Inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos (que visam múltiplos contextos de uma única isoforma TGF β 1) fornecem seletividade maior do que inibidores isoforma-específicos. Inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-independentes (que visam e inibem funções de TGF β 1 independentemente de qual molécula apresentadora está associada com) fornece especificidade de

isoforma permitindo, ao mesmo tempo, cobertura mais ampla de efeitos inibidores através de múltiplas atividades de TGF β 1.

Definições

[091] A fim de que a revelação possa ser mais prontamente compreendida, primeiro serão definidos certos termos. Essas definições devem ser lidas à luz do restante da revelação e como compreendidas por aqueles habilitados na técnica. Salvo definição em contrário, todos os termos técnicos e científicos usados nesse relatório descritivo possuem os mesmos significados comumente compreendidos por aqueles habilitados na técnica. Definições adicionais são apresentadas ao longo da descrição detalhada.

[092] *Anticorpo*: O termo "anticorpo" engloba qualquer estrutura de imunoglobulina ou imunoglobulina-like de ocorrência natural, recombinante, modificada ou modificada geneticamente ou fragmento de ligação ao antígeno ou porção desta, ou derivado desta, como adicionalmente descrita em qualquer outro local nesse relatório descritivo. Dessa forma, o termo se refere a uma molécula de imunoglobulina que se liga especificamente a um antígeno-alvo, e inclui, por exemplo, anticorpos quiméricos, humanizados, totalmente humanos e biespecíficos. Um anticorpo intacto compreenderá geralmente pelo menos duas cadeias pesadas de comprimento total e duas cadeias leves de comprimento total, mas, em alguns casos, pode incluir menos cadeias como, por exemplo, anticorpos de ocorrência natural em camelídeos que podem compreender somente cadeias pesadas. Anticorpos podem ser derivados exclusivamente a partir de uma única fonte, ou podem ser "quiméricos", ou seja, porções diferentes do anticorpo podem ser derivadas de dois anticorpos diferentes.

Anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, podem ser produzidos em hibridomas, por técnicas de DNA recombinante, ou por clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos. O termo "anticorpos", como usado nesse relatório descritivo, inclui anticorpos monoclonais, anticorpos biespecíficos, *minibodies*, anticorpos de domínio, anticorpos sintéticos (algumas vezes referidos nesse relatório descritivo "miméticos de anticorpo"), anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos humanos, fusões de anticorpo (algumas vezes referidas nesse relatório descritivo "conjugados de anticorpo"), respectivamente. Em algumas modalidades, o termo também engloba peptibodies.

[093] *Antígeno*: O termo "antígeno" se refere a uma estrutura molecular que fornece um epítopo, por exemplo, uma molécula ou uma porção de uma molécula, ou um complexo de moléculas ou porções de moléculas, capaz de ser ligada por um agente de ligação seletivo, por exemplo, uma proteína de ligação ao antígeno (incluindo, por exemplo, um anticorpo). Dessa forma, um agente de ligação seletivo pode se ligar especificamente a um antígeno que é formado por dois ou mais componentes em um complexo. Em algumas modalidades, o antígeno é capaz de ser usado em um animal para produzir anticorpos capazes de ligação àquele antígeno. Um antígeno pode possuir um ou mais epítopos que são capazes de interagir com proteínas de ligação ao antígeno diferentes, por exemplo, anticorpos.

[094] *Porção/fragmento de ligação ao antígeno*: Os termos "porção de ligação ao antígeno" ou "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo, como usados nesse relatório descritivo, se referem a um ou mais fragmentos de um

anticorpo que retêm a habilidade para se ligar especificamente a um antígeno (por exemplo, TGF β 1). Porções de ligação ao antígeno incluem, sem limitação, qualquer polipeptídeo ou glicoproteína de ocorrência natural, enzimaticamente obtenível, sintético ou geneticamente modificado, que se liga especificamente a um antígeno para formar um complexo. Em algumas modalidades, uma porção de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser derivada, por exemplo, de moléculas de anticorpo inteiras usando quaisquer técnicas padronizadas adequadas como, por exemplo, digestão proteolítica ou técnicas de engenharia genética recombinante que envolvem a manipulação e expressão de DNA que codifica domínios variáveis e, opcionalmente, constantes, de anticorpo. Exemplos não limitantes de porções de ligação ao antígeno incluem: (i) fragmentos Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) fragmentos F(ab')₂, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobradiça; (iii) fragmentos Fd que consistem nos domínios VH e CH1; (iv) fragmentos Fv que consistem nos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo; (v) moléculas Fv de cadeia única (scFv) (veja, por exemplo, Bird e cols. (1988) *Science* 242: 423-426; e Huston e cols. (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 5.879-5.883); (vi) fragmentos dAb (veja, por exemplo, Ward e cols. (1989) *Nature* 341: 544-546); e (vii) unidades de reconhecimento mínimas que consistem nos resíduos de aminoácidos que mimetizam a região hipervariável de um anticorpo (por exemplo, uma região determinante de complementaridade (CDR) isolada). Outras formas de anticorpos de cadeia única, por exemplo, *diabodies*,

também estão englobadas. O termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo inclui um "fragmento Fab de cadeia única", de outro modo conhecido como um "scFab", que compreende um domínio variável da cadeia pesada de anticorpo (VH), um domínio constante de anticorpo 1 (CH1), um domínio variável da cadeia leve de anticorpo (VL), um domínio constante da cadeia leve de anticorpo (CL) e um vinculador, em que os referidos domínios de anticorpo e o referido vinculador possuem uma das seguintes ordens na direção do terminal-N para o terminal-C: a) VH-CH1-vinculador-VL-CL, b) VL-CL-vinculador-VH-CH1, c) VH-CL-vinculador-VL-CH1 ou d) VL-CH1-vinculador-VH-CL; e em que o referido vinculador é um polipeptídeo de pelo menos 30 aminoácidos, preferivelmente entre 32 e 50 aminoácidos.

[095] *Câncer*: O termo "câncer", como usado nesse relatório descritivo, se refere à condição fisiológica em eucariotas multicelulares que é tipicamente caracterizada por proliferação celular desregulada e malignidade. Dessa forma, o termo amplamente engloba tumores sólidos, cânceres sanguíneos (por exemplo, leucemias), bem como mielofibrose e mieloma múltiplo.

[096] *TGFβ1 associado à célula*: O termo se refere ao TGFβ1 ou seu complexo de sinalização (por exemplo, TGFβ1 pró/Latente) que está ligado à membrana (por exemplo, aderido à superfície da célula). Tipicamente, essa célula é uma célula imune. TGFβ1 que é apresentado por GARP ou LRRC33 é um TGFβ1 associado à célula.

[097] *Inibidor de checkpoint*: No contexto dessa revelação, inibidores de *checkpoint* se referem aos inibidores de *checkpoint* imune e carregam o significado como

compreendido na técnica. Tipicamente, o alvo é uma molécula receptora em células T ou células NK, ou ligante da superfície celular correspondente em células apresentadoras de antígeno (APCs) ou células tumorais. *Checkpoints* imunes são ativados em células imunes para evitar a imunidade inflamatória que se desenvolve contra o "auto". Portanto, a alteração do equilíbrio do sistema imune por meio da inibição do *checkpoint* deve permitir que ele seja totalmente ativado para detectar e eliminar o câncer. Os melhores receptores inibidores conhecidos implicados no controle da resposta imune são o antígeno de linfócito-T citotóxico-4 (CTLA-4), proteína de morte celular programada 1 (PD-1), domínio de imunoglobulina de célula T e domínio de mucina-3 (TIM3), gene de ativação de linfócito 3 (LAG3), receptor de célula *killer* imunoglobulina-like (KIR), receptor do fator de necrose tumoral induzida por glicocorticóide (GITR) e supressor da ativação de célula T contendo imunoglobulina (Ig) de domínio-V (VISTA). Exemplos não limitantes de inibidores de *checkpoint* incluem: Nivolumab, Pembrolizumab, BMS-936559, Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab, Ipilimumab, Tremelimumab, IMP-321, BMS-986016 e Lirilumab.

[098] *Benefício clínico*: Como usado nesse relatório descritivo, o termo "benefícios clínicos" visa incluir tanto eficácia quanto segurança de uma terapia. Dessa forma, o tratamento terapêutico que obtém um benefício clínico desejável é tanto eficaz quanto seguro (por exemplo, com toxicidades ou eventos adversos toleráveis ou aceitáveis).

[099] *Terapia combinada*: O termo "terapia combinada" se refere aos regimes de tratamento para uma indicação clínica que compreendem dois ou mais agentes terapêuticos. Dessa

forma, o termo se refere a um regime terapêutico no qual uma primeira terapia que compreende uma primeira composição (por exemplo, ingrediente ativo) é administrada em conjunto com uma segunda terapia que compreende uma segunda composição (ingrediente ativo) a um paciente, destinadas a tratar a mesma doença ou uma doença ou condição clínica sobreposta. A primeira e segunda composições podem, ambas, atuar no mesmo alvo celular, ou em alvos celulares distintos. A frase "em conjunto com", no contexto de terapias combinadas, significa que os efeitos terapêuticos de uma primeira terapia se sobrepõem temporariamente e/ou espacialmente com efeitos terapêuticos de uma segunda terapia no indivíduo que recebe a terapia combinada. Dessa forma, as terapias combinadas podem ser formuladas como uma formulação única para administração concomitante, ou como formulações separadas, para administração sequencial das terapias.

[100] *Epítopo combinatório*: Em algumas modalidades, os anticorpos inibidores da invenção podem se ligar a um epítopo formado por dois ou mais componentes (por exemplo, porções ou segmentos) de um complexo de TGF β 1 pró/Latente. Um epítopo desse tipo é referido como um epítopo combinatório. Dessa forma, um epítopo combinatório pode compreender resíduo (ou resíduos) de aminoácido de um primeiro componente do complexo, e resíduo (ou resíduos) de aminoácido de um segundo componente do complexo, e assim por diante. Cada componente pode ser de uma única proteína ou de duas ou mais proteínas de um complexo antigênico. A ligação de um anticorpo a um epítopo combinatório não depende simplesmente de uma sequência de aminoácidos primária do antígeno. Ao invés disso, um epítopo combinatório é formado com contribuições

estruturais de dois ou mais componentes (por exemplo, porções ou segmentos, por exemplo, resíduos de aminoácidos) de um antígeno ou complexos antigênicos.

[101] *Competição* ou *competição cruzada*: O termo "competir", quando usado no contexto de proteínas de ligação ao antígeno (por exemplo, um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste) que compete pelo mesmo epítopo, significa competição entre proteínas de ligação ao antígeno, como determinada por um ensaio no qual a proteína de ligação ao antígeno que está sendo testada evita ou inibe (por exemplo, reduz) a ligação específica de uma proteína de ligação ao antígeno de referência a um antígeno comum (por exemplo, TGF β 1 ou um fragmento deste). Vários tipos de ensaios de ligação competitiva podem ser usados para determinar se uma proteína de ligação ao antígeno compete com outra, por exemplo: imunoensaio direto ou indireto em fase sólida (RIA), imunoensaio de enzima direto ou indireto em fase sólida (EIA), ensaio de competição em sanduíche; EIA direto de biotina-avidina em fase sólida; ensaio direto marcado em fase sólida, e ensaio em sanduíche direto marcado em fase sólida. Normalmente, quando uma proteína de ligação ao antígeno em competição está presente em excesso, ela inibirá (por exemplo, reduzirá) a ligação específica de uma proteína de ligação ao antígeno de referência a um antígeno comum por pelo menos 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% ou 75% ou mais. Em alguns casos, a ligação é inibida por pelo menos 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97%, ou 97% ou mais. Em algumas modalidades, um primeiro anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste e um segundo anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste bloqueiam de forma cruzada entre

eles com relação ao mesmo antígeno, por exemplo, como testado por Biacor ou Octet, usando condições de teste padronizadas, por exemplo, de acordo com as instruções do fabricante (por exemplo, ligação testada em temperatura ambiente, aproximadamente 20-25°C). Em algumas modalidades, o primeiro anticorpo ou fragmento deste e o segundo anticorpo ou fragmento deste podem ter o mesmo epítopo. Em outras modalidades, o primeiro anticorpo ou fragmento deste e o segundo anticorpo ou fragmento deste podem ter epítopos não idênticos, mas sobrepostos. Ainda em modalidades adicionais, o primeiro anticorpo ou fragmento deste e o segundo anticorpo ou fragmento deste podem ter epítopos separados (diferentes) que estão nas proximidades em um espaço tridimensional, de modo que a ligação do anticorpo seja bloqueada de forma cruzada por meio de impedimento estérico. O termo "bloqueio cruzado" significa que a ligação do primeiro anticorpo a um antígeno evita a ligação do segundo anticorpo ao mesmo antígeno e, similarmente, a ligação do segundo anticorpo a um antígeno evita a ligação do primeiro anticorpo ao mesmo antígeno.

[102] *Região determinante de complementaridade*: Como usado nesse relatório descritivo, o termo "CDR" se refere à região determinante de complementaridade dentro de sequências variáveis de anticorpo. Há três CDRs em cada uma das regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve, que são designadas CDR1, CDR2 e CDR3, para cada uma das regiões variáveis. O termo "conjunto de CDR", como usado nesse relatório descritivo, se refere a um grupo de três CDRs que ocorrem em uma região variável única que podem se ligar ao antígeno. Os limites exatos dessas CDRs foram definidos

diferentemente de acordo com diferentes sistemas. O sistema descrito por Kabat (Kabat e cols. (1987; 1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest" ("National Institutes of Health", Bethesda, Md.) não apenas fornece um sistema de numeração de resíduos inequívoco aplicável a qualquer região variável de um anticorpo, mas também fornece limites precisos de resíduos que definem as três CDRs. Essas CDRs podem ser referidas como CDRs de Kabat. Chothia e colaboradores (Chothia & Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; e Chothia e cols. (1989) *Nature* 342: 877-883) verificaram que certas subporções dentro das CDRs de Kabat adotam conformações de arcabouço peptídico quase idênticas, apesar de terem maior diversidade no nível de sequência de aminoácidos. Essas subporções foram designadas como L1, L2 e L3 ou H1, H2 e H3, em que o "L" e o "H" designam as regiões da cadeia leve e da cadeia pesada, respectivamente. Essas regiões podem ser referidas como CDRs de Chothia, que possuem limites que se sobrepõem com as CDRs de Kabat. Outros limites que definem CDRs que se sobrepõem com as CDRs de Kabat foram descritos por Padlan (1995) *FASEB J.* 9: 133-139 e MacCallum (1996) *J. Mol. Biol.* 262 (5): 732-45. Ainda outras definições dos limites de CDR podem não seguir rigorosamente um dos sistemas desse relatório descritivo, mas irão, no entanto, se sobrepor com as CDRs de Kabat, embora possam ser abreviados ou alongados à luz da predição ou achados experimentais que resíduos ou grupos de resíduos particulares ou até mesmo CDRs inteiras não impactam significativamente a ligação ao antígeno. Os métodos usados nesse relatório descritivo podem utilizar CDRs definidas de acordo com qualquer um desses sistemas, embora certas modalidades utilizem as CDRs

definidas por Kabat ou Chothia.

[103] *Epítopo conformacional*: Em algumas modalidades, os anticorpos inibidores da invenção podem se ligar a um epítopo que é conformação-específico. Um epítopo desse tipo é referido como um epítopo conformacional, epítopo conformação-específico, epítopo conformação-dependente ou epítopo conformação-sensível. Um anticorpo ou fragmento deste correspondente que se liga especificamente a um epítopo desse tipo pode ser referido como anticorpo conformação-específico, anticorpo conformação-seletivo ou anticorpo conformação-dependente. A ligação de um antígeno a um epítopo conformacional depende da estrutura tridimensional (conformação) do antígeno ou complexo antigênico.

[104] *Região constante*: Um domínio constante de imunoglobulina se refere a um domínio constante da cadeia pesada ou leve. Sequências de aminoácidos do domínio constante da cadeia pesada e da cadeia leve de IgG humana são conhecidas na técnica.

[105] *Contexto-permissivo; contexto-independente*: Inibidores de TGF β "contexto-permissivos" e "contexto-independentes" são inibidores de contexto amplo que atuam mediante mais de um dos modos da função de TGF β . Um "inibidor contexto-permissivo" de TGF β é um agente capaz de inibir múltiplos contextos da função de TGF β , por exemplo, atividades de TGF β associadas com pelo menos dois dos seguintes: GARP (também referido como LRRC32), LRRC33, LTBP1 e LTBP3. Entre os inibidores contexto-permissivos, quando um agente é capaz de inibir atividades de TGF β independentemente de moléculas apresentadoras específicas, esse inibidor é referido como um inibidor "contexto-independente". Dessa

forma, um inibidor de TGF β contexto-independente pode inibir atividades de TGF β associadas com todos os seguintes: GARP, LRRC33, LTBP1 e LTBP3. Em algumas modalidades, inibidores contexto-permissivos e contexto-independentes podem exercer atividades inibidoras preferenciais ou tendenciosas em direção a um ou mais contextos em relação a outros.

[106] *TGF β 1 associado à ECM*: O termo se refere ao TGF β 1 ou seu complexo de sinalização (por exemplo, TGF β 1 pró/Latente) que é um componente (por exemplo, depositado dentro) da matriz extracelular. TGF β 1 que é apresentado por LTBP1 ou LTBP3 é um TGF β 1 associado à ECM.

[107] *Quantidade eficaz*: Uma "quantidade eficaz" (ou quantidade terapeuticamente eficaz) é uma dosagem ou regime de dosagem que obtém benefícios clínicos estatisticamente significantes em uma população de pacientes.

[108] *Epítopo*: O termo "epítopo" inclui qualquer determinante molecular (por exemplo, determinante de polipeptídeo) que possa se ligar especificamente a um agente de ligação, imunoglobulina ou receptor de célula T. Em certas modalidades, determinantes de epítopo incluem agrupamentos de moléculas de superfície quimicamente ativos, por exemplo, aminoácidos, cadeias laterais de açúcar, fosforil ou sulfonil e, em certas modalidades, podem ter características estruturais tridimensionais específicas e/ou características de carga específicas. Um epítopo é uma região de um antígeno que é ligada por uma proteína de ligação. Dessa forma, um epítopo consiste nos resíduos de aminoácidos de uma região de um antígeno (ou fragmento deste) que sabidamente se liga ao sítio complementar no parceiro de ligação específico. Um fragmento antigênico pode conter mais de um epítopo. Em

certas modalidades, um anticorpo é dito que se liga especificamente a um antígeno quando ele reconhece seu antígeno-alvo em uma mistura complexa de proteínas e/ou macromoléculas. Por exemplo, anticorpos são ditos que "se ligam ao mesmo epítopo" se os anticorpos competem de forma cruzada (um evitando a ligação ou modulando o efeito do outro). Além disso, definições estruturais de epítopos (sobrepostos, similares, idênticos) são informativas, mas definições funcionais são frequentemente mais relevantes, na medida em que englobam parâmetros estruturais (ligação) e funcionais (modulação, competição).

[109] *Fibrose*: O termo "fibrose" ou "condição/distúrbio fibrótico" se refere ao processo ou manifestação caracterizada pelo acúmulo patológico de componentes da matriz extracelular (ECM), por exemplo, colágenos, dentro de um tecido ou órgão.

[110] *Complexo GARP-TGF β 1*: Como usado nesse relatório descritivo, o termo "complexo GARP-TGF β 1" se refere a um complexo de proteína que compreende uma forma de pró-proteína ou forma latente de uma proteína de fator de transformação de crescimento- β 1 (TGF β 1) e uma proteína predominante de repetições de glicoproteína-A (GARP) ou fragmento ou variante desta. Em algumas modalidades, uma forma de pró-proteína ou forma latente de proteína TGF β 1 pode ser referida como "proteína TGF β 1 pró/Latente". Em algumas modalidades, um complexo GARP-TGF β 1 compreende GARP ligada covalentemente com TGF β 1 pró/Latente por meio de uma ou mais ligações dissulfeto. Em outras modalidades, um complexo GARP-TGF β 1 compreende GARP ligada não covalentemente com TGF β 1 pró/Latente. Em algumas modalidades, um complexo GARP-TGF β 1

é um complexo de ocorrência natural, por exemplo, um complexo GARP-TGF β 1 em uma célula. Um complexo GARP-TGF β 1 exemplar é mostrado na FIG. 3.

[111] *Anticorpo humano*: O termo "anticorpo humano", como usado nesse relatório descritivo, visa incluir anticorpos que possuem regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Os anticorpos humanos da presente revelação podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagenese aleatória ou sítio-específica *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo, nas CDRs e, em particular, CDR3. No entanto, o termo "anticorpo humano", como usado nesse relatório descritivo, não visa incluir anticorpos nos quais sequências de CDR derivadas da linhagem germinativa de outra espécie mamífera, por exemplo, um camundongo, foram enxertadas em sequências *framework* humanas.

[112] *Anticorpo humanizado*: O termo "anticorpo humanizado" se refere aos anticorpos que compreendem sequências da região variável da cadeia pesada e leve de uma espécie não humana (por exemplo, um camundongo), mas nos quais pelo menos uma porção da sequência de VH e/ou VL foi alterada para ser mais "humana-like", ou seja, mais similar às sequências variáveis da linhagem germinativa humana. Um tipo de anticorpo humanizado é um anticorpo com CDR enxertada, no qual sequências de CDR humana são introduzidas em sequências de VH e VL não humanas para substituir as sequências de CDR não humanas correspondentes. Além disso, um "anticorpo humanizado" é um anticorpo, ou uma variante,

derivado, análogo ou fragmento deste, que se liga imunologicamente especificamente a um antígeno de interesse e que compreende uma região FR que possui substancialmente a sequência de aminoácidos de um anticorpo humano e uma região CDR que possui substancialmente a sequência de aminoácidos de um anticorpo não humano. Como usado nesse relatório descritivo, o termo "substancialmente", no contexto de uma CDR, se refere a uma CDR que possui uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idêntica à sequência de aminoácidos de uma CDR de anticorpo não humano. Um anticorpo humanizado compreende substancialmente tudo de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) em que todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às daquelas de uma imunoglobulina não humana (ou seja, anticorpo doador) e todas ou substancialmente todas as regiões FR são aquelas de uma sequência de consenso de imunoglobulina humana. Em uma modalidade, um anticorpo humanizado também compreende pelo menos uma porção de uma região Fc de imunoglobulina, tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado contém a cadeia leve, bem como pelo menos o domínio variável de uma cadeia pesada. O anticorpo também pode incluir as regiões CH1, de dobradiça, CH2, CH3 e CH4 da cadeia pesada. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado contém somente uma cadeia leve humanizada. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado contém somente uma cadeia pesada humanizada. Em modalidades específicas, um anticorpo humanizado contém somente um domínio variável humanizado de

uma cadeia leve e/ou cadeia pesada humanizada.

[113] *Isoforma-específico*: O termo "especificidade de isoforma" se refere à habilidade de um agente para discriminar uma isoforma em relação a outras isoformas estruturalmente relacionadas (ou seja, seletividade). Um inibidor de TGF β isoforma-específico exerce sua atividade inibidora em direção a uma isoforma de TGF β , mas não às outras isoformas de TGF β em certa concentração. Por exemplo, um anticorpo de TGF β 1 isoforma-específico se liga seletivamente a TGF β 1. Um inibidor TGF β 1-específico (anticorpo) preferencialmente visa (se liga e, dessa forma, inibe) a isoforma TGF β 1 em relação a TGF β 2 ou TGF β 3 com afinidade substancialmente maior. Por exemplo, a seletividade nesse contexto pode se referir a pelo menos uma diferença de 500-1.000 vezes nas respectivas afinidades, como medidas por um ensaio de ligação *in vitro* como, por exemplo, Octet e Biacor. Em algumas modalidades, a seletividade é tal que o inibidor, quando usado em uma dosagem eficaz para inibir TGF β 1 *in vivo*, não inibe TGF β 2 e TGF β 3. Por exemplo, um anticorpo pode se ligar preferencialmente a TGF β 1 na afinidade de aproximadamente 1 pM, enquanto o mesmo anticorpo pode se ligar a TGF β 2 e/ou TGF β 3 a aproximadamente 0,5-50 nM. Para que um inibidor desse tipo seja útil como um produto terapêutico, a dosagem para obter efeitos desejáveis (por exemplo, quantidades terapeuticamente eficazes) deve cair dentro da janela na qual o inibidor pode inibir eficazmente a isoforma TGF β 1, sem inibir TGF β 2 ou TGF β 3.

[114] *Isolado*: Um anticorpo "isolado", como usado nesse relatório descritivo, se refere a um anticorpo que é

substancialmente livre de outros anticorpos que possuem diferentes especificidades antigênicas. Em algumas modalidades, um anticorpo isolado é substancialmente livre de outro material celular e/ou produtos químicos indesejados.

[115] *Localizado*: No contexto da presente revelação, o termo "localizado" (como em "tumor localizado") se refere às anormalidades anatomicamente isoladas ou isoláveis, por exemplo, malignidades sólidas, ao contrário de doença sistêmica. Certas leucemias, por exemplo, podem ter tanto um componente localizado (por exemplo, a medula óssea) quanto um componente sistêmico (por exemplo, células sanguíneas circulantes) para a doença.

[116] *Complexo LRRC33-TGF β 1*: Como usado nesse relatório descritivo, o termo "complexo LRRC33-TGF β 1" se refere a um complexo entre uma forma de pró-proteína ou forma latente de proteína de fator de transformação de crescimento- β 1 (TGF β 1) e a Proteína Contendo Repetição Rica em Leucina 33 (LRRC33; também conhecida como Negative Regulador de Espécies de Oxigênio Reativas ou NRROS) ou fragmento ou variante desta. Em algumas modalidades, um complexo LRRC33-TGF β 1 compreende LRRC33 ligada covalentemente com TGF β 1 pró/Latente por meio de uma ou mais ligações dissulfeto. Em outras modalidades, um complexo LRRC33-TGF β 1 compreende LRRC33 ligada não covalentemente com TGF β 1 pró/Latente. Em algumas modalidades, um complexo LRRC33-TGF β 1 é um complexo de ocorrência natural, por exemplo, um complexo LRRC33-TGF β 1 em uma célula.

[117] *Complexo LTBP1-TGF β 1*: Como usado nesse relatório descritivo, o termo "complexo LTBP1-TGF β 1" se refere a um

complexo de proteína que compreende uma forma de pró-proteína ou forma latente de proteína de fator de transformação de crescimento- $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) e uma proteína de ligação de TGF-beta latente 1 (LTBP1) ou fragmento ou variante desta. Em algumas modalidades, um complexo LTBP1-TGF $\beta 1$ compreende LTBP1 ligada covalentemente com TGF $\beta 1$ pró/Latente por meio de uma ou mais ligações dissulfeto. Em outras modalidades, um complexo LTBP1-TGF $\beta 1$ compreende LTBP1 ligada não covalentemente com TGF $\beta 1$ pró/Latente. Em algumas modalidades, um complexo LTBP1-TGF $\beta 1$ é um complexo de ocorrência natural, por exemplo, um complexo LTBP1-TGF $\beta 1$ em uma célula. Um complexo LTBP1-TGF $\beta 1$ exemplar é mostrado na FIG. 3.

[118] *Complexo LTBP3-TGF $\beta 1$* : Como usado nesse relatório descritivo, o termo "complexo LTBP3-TGF $\beta 1$ " se refere a um complexo de proteína que compreende uma forma de pró-proteína ou forma latente de proteína de fator de transformação de crescimento- $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) e uma proteína de ligação de TGF-beta latente 3 (LTBP3) ou fragmento ou variante desta. Em algumas modalidades, um complexo LTBP3-TGF $\beta 1$ compreende LTBP3 ligada covalentemente com TGF $\beta 1$ pró/Latente por meio de uma ou mais ligações dissulfeto. Em outras modalidades, um complexo LTBP3-TGF $\beta 1$ compreende LTBP1 ligada não covalentemente com TGF $\beta 1$ pró/Latente. Em algumas modalidades, um complexo LTBP3-TGF $\beta 1$ é um complexo de ocorrência natural, por exemplo, um complexo LTBP3-TGF $\beta 1$ em uma célula. Um complexo LTBP3-TGF $\beta 1$ exemplar é mostrado na FIG. 3.

[119] *Mielofibrose*: "Mielofibrose", também conhecida como osteomielofibrose, é um distúrbio proliferativo da medula óssea relativamente raro (por exemplo, câncer), que pertence a um grupo de doenças denominadas distúrbios

mieloproliferativos. A mielofibrose é classificada no ramo de cromossomo Filadélfia negativo (-) de neoplasias mieloproliferativas. A mielofibrose é caracterizada pela proliferação de um clone anormal de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea e em outros locais e resulta em fibrose, ou na substituição da medula com tecido cicatricial. O termo "mielofibrose", salvo especificação em contrário, se refere à mielofibrose primária (PMF). Isso também pode ser referido como mielofibrose idiopática crônica (CIMF) (os termos "idiopática" e "primária" significam que, nesses casos, a doença é de origem desconhecida ou espontânea). Isso está em contraste com mielofibrose, que se desenvolve secundariamente à policitemia vera ou trombocitopenia essencial. A mielofibrose é uma forma de metaplasia mielóide, que se refere a uma alteração no tipo de célula no tecido que forma o sangue da medula óssea, e frequentemente os dois termos são usados de forma sinônima. Os termos metaplasia mielóide agnogênica e mielofibrose com metaplasia mielóide (MMM) também são usados para se referir à mielofibrose primária.

[120] *Pan-inibidor de TGFβ*: O termo "pan-inibidor de TGFβ" se refere a qualquer agente que é capaz de inibir ou antagonizar múltiplas isoformas de TGFβ. Um inibidor desse tipo pode ser um inibidor de pequena molécula de isoformas de TGFβ. O termo inclui "pan-anticorpo de TGFβ" que se refere a qualquer agente que é capaz de se ligar a mais de uma isoforma de TGFβ, por exemplo, pelo menos duas de TGFβ1, TGFβ2 e TGFβ3. Em algumas modalidades, um pan-anticorpo de TGFβ se liga a todas as três isoformas, ou seja, TGFβ1, TGFβ2 e TGFβ3. Em algumas modalidades, um pan-anticorpo de TGFβ se

liga e neutraliza todas as três isoformas, ou seja, TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3.

[121] *Molécula apresentadora*: O termo "molécula apresentadora" ou "molécula apresentadora" de TGF β é uma entidade proteica que é capaz de se ligar/Ligação à forma (ou formas) inativa de TGF β "apresentando", dessa forma, a pró-proteína em um domínio extracelular. Quatro moléculas apresentadoras de TGF β foram identificadas até hoje: Proteína de ligação de TGF β Latente-1 (LTBP1) e LTBP3 estão depositadas na matriz extracelular (ou seja, componentes da ECM), enquanto a Proteína Predominante de Repetições de Glicoproteína-A (GARP/LRRC32) e a Proteína Contendo Repetição Rica em Leucina 33 (LRRC33) contêm um domínio transmembrana e apresentam TGF β 1 latente na superfície de certas células, por exemplo, células imunes. A isoforma TGF β 1 isoladamente foi implicada em diversos processos biológicos tanto em condições normais quanto em condições de doença. Essas incluem, sem limitação, a manutenção da homeostasia tecidual, resposta à inflamação, reorganização da ECM como, por exemplo, cicatrização de feridas, e regulação de respostas imunes, bem como fibrose de órgãos, câncer e autoimunidade.

[122] *Pró-TGF β 1*: O termo "pró-TGF β 1", como usado nesse relatório descritivo, visa englobar formas precursoras de complexo de TGF β 1 inativo que compreende uma sequência do pró-domínio de TGF β 1 dentro do complexo. Dessa forma, o termo pode incluir as formas pró-, bem como as formas latentes de TGF β 1. A expressão "TGF β 1 pró/Latente" pode ser usada de forma intercambiável. A forma "pró" de TGF β 1 existe antes da clivagem proteolítica no sítio de furina. Uma vez clivada,

a forma resultante é dita a forma "latente" de TGF β 1. O complexo "latente" permanece associado até desencadeamento adicional da ativação, por exemplo, um evento de ativação dirigida por integrina. Como ilustrado na FIG. 3, o complexo pró-TGF β 1 é composto por polipeptídeos diméricos de pró-proteína TGF β 1, ligados com ligações dissulfeto. Deve ser observado que o adjetivo "latente" pode ser usado geralmente para descrever o estado "inativo" de TGF β 1, antes de eventos de ativação mediados por integrina ou outros eventos de ativação.

[123] *Células T regulatórias*: "Células T regulatórias", ou Tregs, são caracterizadas pela expressão dos biomarcadores CD4, FOXP3 e CD25. Tregs são algumas vezes denominadas células T supressoras e representam uma subpopulação de células T que modulam o sistema imune, mantêm a tolerância a autoantígenos, e evitam doença autoimune. Tregs são imunossupressoras e geralmente suprimem ou infra-regulam a indução e proliferação de células T efetoras (Teff). Tregs podem se desenvolver no timo (as denominadas Tregs CD4+ Foxp3+ "naturais") ou se diferenciam a partir de células T CD4+ naïve na periferia, por exemplo, após exposição ao TGF β ou ácido retinóico.

[124] *Tumor sólido*: O termo "tumor sólido" se refere aos distúrbios proliferativos que resultam em um crescimento anormal ou massa anormal de tecido que normalmente não contém cistos ou áreas líquidas. Tumores sólidos podem ser benignos (não cancerosos), ou malignos (cancerosos). Tumores sólidos podem ser formados por células cancerosas (malignas), células estromais, incluindo CAFs, e leucócitos infiltrantes, por exemplo, macrófagos e linfócitos.

[125] *Ligação específica*: Como usado nesse relatório descritivo, o termo "ligação específica" ou "se liga especificamente" significa que a interação do anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, com um antígeno é dependente da presença de uma estrutura particular (por exemplo, um determinante antigênico ou epítopo). Por exemplo, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, se liga a uma proteína específica ao invés de às proteínas de forma geral. Em algumas modalidades, um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, se liga especificamente a um alvo, por exemplo, TGF β 1, se o anticorpo possui uma K_D para o alvo de pelo menos cerca de 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M, ou menos. Em algumas modalidades, o termo "ligação específica a um epítopo de TGF β 1", "se liga especificamente a um epítopo de TGF β 1", "ligação específica ao TGF β 1", ou "se liga especificamente ao TGF β 1", como usado nesse relatório descritivo, se refere a um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, que se liga ao TGF β 1 e possui uma constante de dissociação (K_D) de $1,0 \times 10^{-7}$ M ou menos, como determinado por ressonância de plasmônio de superfície. Em uma modalidade, um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, pode se ligar especificamente a ortólogos tanto humanos quanto não humanos (por exemplo, de camundongo) de TGF β 1.

[126] *Indivíduo*: O termo "indivíduo", no contexto de aplicações terapêuticas, se refere a um indivíduo que recebe cuidados ou intervenção clínica, por exemplo, tratamento, diagnóstico etc. Indivíduos adequados incluem vertebrados incluindo, sem limitação, mamíferos (por exemplo, mamíferos

humanos e não humanos). Quando o indivíduo é um indivíduo humano, o termo "paciente" pode ser usado de forma intercambiável. Em um contexto clínico, o termo "uma população de pacientes" ou "subpopulação de pacientes" é usado para se referir a um grupo de indivíduos que se enquadra dentro de um conjunto de critérios, por exemplo, critérios clínicos (por exemplo, apresentações de doença, estágios de doença, suscetibilidade a certas condições, responsividade à terapia etc.), história médica, estado de saúde, sexo, faixa etária, critérios genéticos (por exemplo, carreador de certa mutação, polimorfismo, duplicações de genes, repetições de sequência de DNA etc.) e fatores ligados ao estilo de vida (por exemplo, tabagismo, consumo de álcool, exercícios etc.).

[127] *Distúrbio associado ao TGF β 1*: Um "distúrbio associado ao TGF β 1" significa qualquer doença ou distúrbio, no qual pelo menos parte da patogênese e/ou progressão é atribuível à sinalização de TGF β 1 ou à sua desregulação.

[128] *Inibidor de TGF β* : O termo "inibidor de TGF β " se refere a qualquer agente capaz de antagonizar atividades biológicas ou função do fator de crescimento TGF β (por exemplo, TGF β 1, TGF β 2 e/ou TGF β 3). O termo não visa limitar seu mecanismo de ação e inclui, por exemplo, inibidores neutralizantes, antagonistas de receptor, capturas de ligante solúvel, e inibidores da ativação de TGF β .

[129] A "*família TGF β* " é uma classe dentro da superfamília TGF β e contém três isoformas: TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3, que são estruturalmente similares.

[130] *Toxicidade*: Como usado nesse relatório descritivo, o termo "toxicidade" ou "toxicidades" se refere aos efeitos

indesejados *in vivo* em pacientes associados a uma terapia administrada aos pacientes, por exemplo, efeitos colaterais e eventos adversos indesejáveis. "Tolerabilidade" se refere a um nível de toxicidades associado a uma terapia ou regime terapêutico, que pode ser razoavelmente tolerado pelos pacientes, sem suspender a terapia em consequência das toxicidades.

[131] *Tratar/tratamento*: O termo "tratar" e "tratamento" inclui tratamentos terapêuticos, tratamentos profiláticos, e aplicações nas quais se reduz o risco de que um indivíduo desenvolverá um distúrbio ou outro fator de risco. Dessa forma, o termo significa amplamente: causar benefícios terapêuticos em um paciente, por exemplo, por aumento ou reforço da imunidade do corpo; reduzir ou reverter supressão imune; reduzir, remover ou erradicar células ou substâncias danosas do corpo; reduzir a carga da doença (por exemplo, carga tumoral); evitar a recorrência ou recidiva; prolongar um período refratário e/ou, de algum outro modo, aumentar a sobrevida. O termo inclui tratamentos terapêuticos, tratamentos profiláticos, e aplicações nas quais se reduz o risco de que um indivíduo desenvolverá um distúrbio ou outro fator de risco. O tratamento não exige a cura completa de um distúrbio e engloba modalidades nas quais se reduz os sintomas ou fatores de risco subjacentes. No contexto de terapia combinada, o termo também pode ser referir: i) à habilidade de uma segunda terapêutica para reduzir a dosagem eficaz de uma primeira terapêutica, de modo a reduzir os efeitos colaterais e aumentar a tolerabilidade; ii) a habilidade de uma segunda terapia para tornar o paciente mais responsivo a uma primeira terapia; e/ou iii) a

habilidade para efetuar benefícios clínicos aditivos ou sinérgicos.

[132] *Macrófagos associados ao tumor*: “Macrófagos associados ao tumor (TAMs)” são macrófagos polarizados/ativados com fenótipos pró-tumorais. TAMs podem ser monócitos/macrófagos originados da medula recrutados para o local de tumor ou macrófagos residentes no tecido que são derivados de progenitores eritromielóides. A diferenciação de monócitos/macrófagos em TAMs é influenciada por diversos fatores, incluindo sinais químicos locais como, por exemplo, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e outras moléculas que atuam como ligantes, bem como interações célula-célula entre os monócitos/macrófagos que estão presentes no nicho (microambiente tumoral). Geralmente, monócitos/macrófagos podem ser polarizados nos denominados subtipos “M1” ou “M2”, o último estando associado com fenótipo mais pró-tumoral. Em um tumor sólido, até 50% da massa tumoral podem corresponder a macrófagos, que são preferencialmente M2-polarizados.

[133] *Microambiente tumoral*: O termo “microambiente tumoral (TME)” se refere a um nicho de doença local, em que um tumor (por exemplo, tumor sólido) reside *in vivo*.

[134] *Região variável*: O termo “região variável” ou “domínio variável” se refere a uma porção das cadeias leves e/ou pesadas de um anticorpo, incluindo tipicamente aproximadamente os 120 a 130 aminoácidos do terminal amino na cadeia pesada e cerca de 100 a 110 aminoácidos do terminal amino na cadeia leve. Em certas modalidades, as regiões variáveis de anticorpos diferentes diferem intensamente em termos de sequência de aminoácidos, até mesmo entre

anticorpos da mesma espécie. A região variável de um anticorpo tipicamente determina a especificidade de um anticorpo particular por seu alvo.

[135] Exceto nos exemplos operacionais, ou quando indicado de outro modo, todos os números que expressam quantidades de ingredientes ou condições de reação usados nesse relatório descritivo devem ser subentendidos como modificados em todas as ocorrências pelo termo "cerca de". O termo "cerca de", quando usado em conexão com percentagens, pode significar $\pm 1\%$.

[136] Os artigos indefinidos "um" e "uma", como aqui usados e no relatório descritivo e nas reivindicações, a menos que indicado claramente o contrário, devem ser subentendidos como significando "pelo menos um".

[137] A frase "e/ou", como aqui usada e no relatório descritivo e nas reivindicações, deve ser subentendido como significando "um ou ambos" dos elementos assim coligados, ou seja, elementos que estão conjuntamente presentes em alguns casos e separadamente presentes em outros casos. Outros elementos podem opcionalmente estar presentes, além dos elementos especificamente identificados pela cláusula "e/ou", estejam ou não relacionados àqueles especificamente identificados, a menos que indicado claramente o contrário. Dessa forma, como um exemplo não limitante, uma referência a "A e/ou B", quando usada em conjunto com linguagem em aberto como, por exemplo, "que compreende", pode se referir, em uma modalidade, a A sem B (incluindo opcionalmente elementos diferentes de B); em outra modalidade, a B sem A (incluindo opcionalmente elementos diferentes de A); ainda em outra modalidade, tanto A quanto B (incluindo

opcionalmente outros elementos); etc.

[138] Como usada aqui e no relatório descritivo e nas reivindicações, a frase "pelo menos um", em referência a uma lista de um ou mais elementos, deve ser subentendida como significando pelo menos um elemento selecionado de qualquer um ou mais dos elementos na lista de elementos, mas não incluindo necessariamente pelo menos um de cada e todos os elementos especificamente listados dentro da lista de elementos e não excluindo quaisquer combinações de elementos na lista de elementos. Essa definição também permite que elementos possam opcionalmente estar presentes além dos elementos especificamente identificados dentro da lista de elementos à qual a frase "pelo menos um" se refere, estejam ou não relacionados àqueles elementos especificamente identificados. Dessa forma, como um exemplo não limitante, "pelo menos um de A e B" (ou, equivalentemente, "pelo menos um de A ou B" ou, equivalentemente "pelo menos um de A e/ou B") pode se referir, em uma modalidade, a pelo menos um, incluindo opcionalmente mais de um, A, sem B presente (e incluindo opcionalmente elementos diferentes de B); em outra modalidade, a pelo menos um, incluindo opcionalmente mais de um, B, sem A presente (e incluindo opcionalmente elementos diferentes de A); ainda em outra modalidade, a pelo menos um, incluindo opcionalmente mais de um, A, e pelo menos um, incluindo opcionalmente mais de um, B (e incluindo opcionalmente outros elementos); etc.

[139] O uso de termos ordinais como, por exemplo, "primeiro", "segundo", "terceiro" etc., nas reivindicações para modificar um elemento da reivindicação não significa, por si só, nenhuma prioridade, precedência ou ordem de um

elemento da reivindicação em relação a outro ou a ordem temporal na qual ações de um método são realizadas, mas são usados simplesmente como marcadores para distinguir um elemento da reivindicação que possui certo nome de outro elemento que possui um mesmo nome (mas para uso do termo ordinal) para distinguir os elementos da reivindicação.

[140] Subentende-se que faixas fornecidas nesse relatório descritivo são uma forma abreviada para todos os valores dentro da faixa. Por exemplo, subentende-se que uma faixa de 1 a 50 inclui qualquer número, combinação de números, ou subfaixa do grupo que consiste em 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 ou 50, por exemplo, 10-20, 1-10, 30-40 etc.

Anticorpos de TGF β 1 isoforma-seletivos, contexto-permissivos /contexto-independentes

[141] A presente invenção fornece anticorpos, e porções de ligação ao antígeno destes, que se ligam a dois ou mais dos seguintes complexos que compreendem TGF β 1 pró/Latente: um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e um complexo LRRC33-TGF β 1. Consequentemente, alguns aspectos da invenção estão relacionados aos anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, que se ligam especificamente a um epítipo dentro desse complexo de TGF β 1, em que o epítipo está disponível para ligação pelo anticorpo, ou porções de ligação ao antígeno deste, quando o TGF β 1 está presente em um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1. Em algumas modalidades, o epítipo está

disponível em consequência de uma alteração conformacional em TGF β 1 quando em complexo com GARP, LTBP1, LTBP3 e/ou LRRC33. Em algumas modalidades, o epítopo em TGF β 1 ao qual os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, se ligam não está disponível quando TGF β 1 não está em complexo com GARP, LTBP1, LTBP3 e/ou LRRC33. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, não se ligam especificamente ao TGF β 2. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, não se ligam especificamente ao TGF β 3. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, não evitam que TGF β 1 se ligue à integrina. Por exemplo, em algumas modalidades, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, não mascaram o sítio de ligação à integrina de TGF β 1. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, inibem a ativação de TGF β 1. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, inibem a liberação de TGF β 1 maduro por um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1.

[142] Os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, fornecidos neste relatório descritivo se ligam especificamente a um epítopo de múltiplos (ou seja, dois ou mais) complexos de TGF β 1, em que o epítopo está disponível para ligação pelo anticorpo, ou porções de ligação ao antígeno deste, quando o TGF β 1 está presente em um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, a LTBP2-TGF β 1 complexo, complexo LTBP3-TGF β 1, complexo LTBP4-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1. Em algumas modalidades, o TGF β 1 compreende a sequência de aminoácidos de mamífero de ocorrência natural.

Em algumas modalidades, o TGF β 1 compreende uma sequência de aminoácidos humana de ocorrência natural. Em algumas modalidades, o TGF β 1 compreende uma sequência de aminoácidos humana, de a macaco, de rato ou de camundongo. Em algumas modalidades, um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, descrito nesse relatório descritivo não se liga especificamente ao TGF β 2. Em algumas modalidades, um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, descrito nesse relatório descritivo não se liga especificamente ao TGF β 3. Em algumas modalidades, um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, descrito nesse relatório descritivo não se liga especificamente ao TGF β 2 ou TGF β 3. Em algumas modalidades, um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, descrito nesse relatório descritivo especificamente se liga a um TGF β 1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 21. As sequências de aminoácidos de TGF β 2 e a sequência de aminoácidos de TGF β 3 são apresentadas nos IDS. DE SEQ. N°s: 22 e 23, respectivamente. Em algumas modalidades, um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, descrito nesse relatório descritivo especificamente se liga a um TGF β 1 que compreende uma sequência de aminoácidos de ocorrência não natural (de outro modo referida nesse relatório descritivo como um TGF β 1 de ocorrência não natural). Por exemplo, um TGF β 1 de ocorrência não natural pode compreender uma ou mais mutações geradas recombinantemente em relação a uma sequência de aminoácidos de TGF β 1 de ocorrência natural. Em algumas modalidades, uma sequência de aminoácidos de TGF β 1, TGF β 2 ou TGF β 3 compreende a sequência de aminoácidos como apresentada nos IDS. DE SEQ. N°s: 24-35, como mostrado

na Tabela 1. Em algumas modalidades, uma sequência de aminoácidos de TGF β 1, TGF β 2 ou TGF β 3 compreende a sequência de aminoácidos como apresentada nos IDS. DE SEQ. N $^{\circ}$ s: 36-43, como mostrado na Tabela 2.

[143] **TGF β 1**

LSTCKTIDMELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRV
AGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEP
VLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYL SNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQ
WLSRGGEIEGFRLSAHCSDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPL
ERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLG
PCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMI
VRCKCS (ID. DE SEQ. N $^{\circ}$: 21)

[144] **TGF β 2**

SLSTCSTLMDQFMRKRIEAI RGQILSKLKLTSPPEDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLL
QEKASRRAAACERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPFYFRIVRFDVSAM
EKNASNLVKAEFRVFRQLQNP KARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRAEG
EWLSFDVTDVAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCTFVPSNNYIIPNKSEELEARFAGIDG
TSTYTSGDQKTIKSTRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAYCFRNVQ
DNCCLRPLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPE
ASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKCKCS (ID. DE SEQ. N $^{\circ}$:
22)

[145] **TGF β 3**

SLSLSTCTTLDFGHIKKRVEAI RGQILSKLRLTSPPPEPTVMTHVPYQVLALYNSTREL
LEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSS
VEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTA
EWLSFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNE
DDHGRGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENC
CVRPLYIDFRQDLGWKWWHEPKGYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASA
SPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVMVKCKCS (ID. DE SEQ. N $^{\circ}$: 23)

Tabela 1. Sequências de aminoácidos de TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3

exemplares.

Proteína	Sequência	ID. DE SEQ. N°
pró-TGFβ1	LSTCKTIDMELVKKRRIEAI RQILSKLRLASPPS QGEVPPGGLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEP EADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMF FNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVE LYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVV RQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGF TTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWK WIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYN QHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQL SNMIVRSCKCS	24
pró-TGFβ1 C4S	LSTSKTIDMELVKKRRIEAI RQILSKLRLASPPS QGEVPPGGLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEP EADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMF FNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVE LYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVV RQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGF TTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWK WIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYN QHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQL SNMIVRSCKCS	25
pró-TGFβ1 D2G	LSTCKTIDMELVKKRRIEAI RQILSKLRLASPPS QGEVPPGGLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEP EADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMF FNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVE LYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVV RQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGF TTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKW IHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQ HNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLS NMIVRSCKCS	26
pró-TGFβ1 C4S D2G	LSTSKTIDMELVKKRRIEAI RQILSKLRLASPPS QGEVPPGGLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEP EADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMF FNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVE LYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVV RQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGF TTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKW	27

	IHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQ HNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLS NMIVRSCKCS	
pró-TGF β 2	SLSTCSTLMDQFMRKRIEAIHQILSKLKLTSPP EDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAAC ERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYR PYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKA RVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRA EGEWLSFDVTDVAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCC TFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTSGDQ KTIKSTRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRR KKRALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKW IHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHRSVLSLYNT INPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLS NMIVKSCKCS	28
pró-TGF β 2 C5S	SLSTSSTLMDQFMRKRIEAIHQILSKLKLTSPP EDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAAC ERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYR PYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKA RVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRA EGEWLSFDVTDVAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCC TFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTSGDQ KTIKSTRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRR KKRALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKW IHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHRSVLSLYNT INPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLS NMIVKSCKCS	29
pró-TGF β 2 C5S D2G	SLSTSSTLMDQFMRKRIEAIHQILSKLKLTSPP EDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAAC ERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYR PYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKA RVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRA EGEWLSFDVTDVAVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCC TFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTSGDQ KTIKSTRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRR KGALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWI HEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHRSVLSLYNTI NPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSN MIVKSCKCS	30
pró-TGF β 2 D2G	SLSTCSTLMDQFMRKRIEAIHQILSKLKLTSPP EDYPEPEEVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAAC ERERSDEEYYAKEVYKIDMPPFFPSENAIPPTFYR PYFRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFRVFRLQNPKA RVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDSKVVKTRA	31

	EGEWLSFDVTDVHEWLHHKDRNLGFKISLHCPCC TFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTSGDQ KTIKSTRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRR KGALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWI HEPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTI NPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSN MIVKSCCKCS	
pró-TGFβ3	SLSLSTCTTLDLFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTS PPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEG CTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPK GITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPS SKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRG TAEWLSFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCH TFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLG RLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPQGGQQRKKR ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWWHE PKGYYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNP EASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMV VKSCCKCS	32
pró-TGFβ3 C7S	SLSLSTSTTLDLFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTS PPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEG CTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPK GITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPS SKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRG TAEWLSFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCH TFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLG RLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPQGGQQRKKR ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWWHE PKGYYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNP EASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMV VKSCCKCS	33
pró-TGFβ3 C7S D2G	SLSLSTSTTLDLFGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTS PPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEG CTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPK GITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPS SKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRG TAEWLSFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCH TFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLG RLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPQGGQQRKGA LDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWWHEP KGYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPE ASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVV KSCCKCS	34

pró-TGF β 3 D2G	SLSLSTCTTLDGHIKKRVEAIRGQILSKLRLTS PPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEG CTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPK GITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFRVLRVPNPS SKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRG TAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCH TFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLG RLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPQGQGGQRKGA LDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEP KGYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPE ASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVV KSCCKCS	35
--------------------------	--	----

Tabela 2. Sequências de aminoácidos não humanas exemplares.

Proteína	Espécie	Sequência	ID. DE SEQ. Nº
pró-TGF β 1	Camundongo	LSTCKTIDMELVKKRIEAIRGQILSKLR LASPPSQGEVPPGGLPEAVLALYNSTRDR VAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVDR NNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVP EPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKY SNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGV VRQWLNQGDGIQGFSAHCSCDSKDNKL HVEINGISPKRRGDLGTIHMNRPFLLLM ATPLERAQHLHSSRHRRALDTNYCFSSTE KNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHA NFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVE QLSNMIVRSCKCS	36
pró-TGF β 1	<i>Cynomolgus</i>	LSTCKTIDMELVKKRIEAIRGQILSKLR LASPPSQGEVPPGGLPEAVLALYNSTRDR VAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVET HNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVP EPVLLSRAELRLRLKLKVEQHVELYQKY SNNSWRYLSNRL LAPSDSPEWLSFDVTGV VRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNTL QVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLM ATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTE KNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHA NFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVE QLSNMIVRSCKCS	37
TGF β 1 LAP C4S	Camundongo	LSTSKTIDMELVKKRIEAIRGQILSKLR LASPPSQGEVPPGGLPEAVLALYNSTRDR VAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVDR	38

		NNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVP EPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKY SNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGV VRQWLNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKL HVEINGISPKRRGDLGTIHDMNRPFLLLM ATPLERAQHLHSSRHR	
TGFβ1 LAP C4S	<i>Cynomolgus</i>	LSTSKTIDMELVKKRIEAIHQILSKLR LASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDR VAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVET HNEIYDKFKQSTHSHIYMFNTSELREAVP EPVLLSRAELRLRLKLVQHVLYQKY SNNSWRYLSNRL LAPSDSPEWLSFDVTGV VRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNLT QVDINGFTTGRRGDLATHGMNRPFLLLM ATPLERAQHLQSSRHR	39
pró- TGFβ1 C4S D2G	Camundongo	LSTSKTIDMELVKKRIEAIHQILSKLR LASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDR VAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVDR NNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVP EPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKY SNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGV VRQWLNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKL HVEINGISPKRRGDLGTIHDMNRPFLLLM ATPLERAQHLHSSRHGALDTNYCFSSTEK NCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHAN FCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP ASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQ LSNMIVRSCKCS	40
pró- TGFβ1 C4S	Camundongo	LSTSKTIDMELVKKRIEAIHQILSKLR LASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDR VAGESADPEPEPEADYYAKEVTRVLMVDR NNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVP EPPLLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKY SNNSWRYLGNRLLTPTDTPEWLSFDVTGV VRQWLNQGDGIQGFRFSAHCSCDSKDNKL HVEINGISPKRRGDLGTIHDMNRPFLLLM ATPLERAQHLHSSRHRRALDTNYCFSSTE KNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHA NFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVE QLSNMIVRSCKCS	41
pró- TGFβ1 C4S	<i>Cynomolgus</i>	LSTSKTIDMELVKKRIEAIHQILSKLR LASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDR VAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVET	42

		<p>HNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVP EPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKY SNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGV VRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNTL QVDINGFTTGRRGDLATHGMNRPFLLLM ATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTE KNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHA NFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVE QLSNMIVRSCKCS</p>	
pró- TGFβ1 C4S D2G	<i>Cynomolgus</i>	<p>LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLR LASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDR VAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVET HNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVP EPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKY SNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGV VRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSKDNTL QVDINGFTTGRRGDLATHGMNRPFLLLM ATPLERAQHLQSSRHGALDTNYCFSSTEK NCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHAN FCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP ASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQ LSNMIVRSCKCS</p>	43
LTBP3	<i>Cynomolgus</i>	<p>GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICK RTCLKGQCRDSCQQGSNMTLIGENGHSTD TLTGSGFRVVVCP LPCMNGGQCSSRNQCL CPPDFTGRFCQVPAGGAGGGTGGSGPGLS RAGALSTGALPPLAPEGDSVASKHAIYAV QVIADPPGPGEPPAQHAAFLVPLGPGQI SAEVQAPPPVNVVRVHHPPEASVQVHRIE SSNAEGAAPSQHLLPHPKPSHPRPPTQKP LGRCFQDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCC GSIGTAWGQSKCHKCPQLQYTGVPKGPV RGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECAMP GVCRHGDCLNNPGSYRCVCPGHS LGPSR TQCIADKPEEKSLCFRLVSPEHQCHPLT TRLTRQLCCCSVGKAWGARCQRCPADGTA AFKEICPAGKGYHILTSHQTLTIQGESDF SLFLHPDGPPKPQQLPESPSQAPPEDTE EERGVTTDSPVSEERSVQQSHPTATTSPA RPYPELISRPSPTMRWFLPDLPPSRSAV EIAPTQVTETDECRLNQNICGHGECVPGP PDYSCHCNPGYRSHPQHRYCVDVNECEAE PCGPGRGICMNTGGSYNCHCNRGYRLHVG</p>	44

		AGGRSCVDLNECAKPHLCGDGGFCINFPG HYKCNCYPGYRLKASRPPVCEDIDECRDP SSCPDGKCENKPGSFKCIACQPGYRSQGG GACRDVNECAEGSPCSPGWCENLPGSFRC TCAQGYAPAPDGRSCVDVDECEAGDVCDN GICTNTPGSFQCQCLSGYHLSRDRSHCED IDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPQG HRLVGGRKCQDIDECTQDPGLCLPHGACK NLQGSYVCVCDEGFTPTQDQHGCEEVEQP HHKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQEC CCSLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHSCLC PDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDECMLF GAEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDG NLLECVDVDECLDESNCRNGVCENTRGY RCACTPPAEYSPAQRQCLSPEEMDVDECQ DPAACRPGRCVNLPGSYRCECRPPWVPGP SGRDCQLPESPAERAPERRDVCWSQRGED GMCAGPQAGPALTFDDCCCRQGRGWGAQC RPCPPRGAGSQCPTSQSESNSFWDTSPLL LGKPRRDEDSSEEDSDECRCVSGRCVPRP GGAVCECPGGFQLDASRARCVDIDECREL NQRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCKAGFAR SRPHGACVPQRRR	
LTBP3	Camundongo	GPAGERGTGGGGALARERFKVVFAPVICK RTCLKGQCRDSCQQGSNMTLIGENGHSTD TLTGSAFRVVVCP LPCMNGGQCSSRNQCL CPPDFTGRFCQVPAAGTGAGTGSSGPGLA RTGAMSTGPLPPLAPEGESVASKHAIYAV QVIADPPGPGEPPAQHAAFLVPLGPGQI SAEVQAPPPVVNVVRVHHPPEASVQVHRIE GPNAEGPASSQHLLPHPKPPHPRPPTQKP LGRCFQDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCC GSIGTAWGQSKCHKCPQLQYTGVPQKVPV RGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDINECAMP GNVCHGDCLNNPGSYRCVCPGHS LGPLA AQCIADKPEEKSLCFRLVSTEHCQHPLT TRLTRQLCCCSVGKAWGARCQRCPADGTA AFKEICPGKGYHILTSHQTLTIQGESDFS LFLHPDGP KPQQLPESPSRAPPLEDTEE ERGVTMDPPVSEERSVQQSHPTTTTSPPR PYPELISRPSPTFHRFLPDLPPSRSAVE IAPTQVTETDECRLNQNICGHGQCVPGPS DYSCHCNAGYRSHPQHRYCVDVNECEAEP CGPGKGICMNTGGSYNCHCNRGYRLHVGA	45

		<p>GGRSCVDLNECAKPHLCGDGGFCINFPGH YKNCYPGYRLKASRPPICEDIDECRDPS TCPDGKCNKPGSFKCIACQPGYRSQGGG ACRDVNECSEGTPCSPGWCENLPGSYRCT CAQYEPAQDGLSCIDVDECEAGKVCQDGI CTNTPGSFQCQCLSGYHLSRDRSRCEDID ECDFPAAACIGGDCINTNGSYRCLCPLGHR LVGGRKCKKDIDEC SQDPGLCLPHACENL QGSYVCVCDGFTLTQDQHGCEEVEQPHH KKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCC SLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHS LVPD GKRLHSGQQHCELCIPAHRDIDECILFGA EICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNL LECVDVDECLDESNCRNGVCENTRGGYRC ACTPPAEYSPAQAQCLIPERWSTPQRDVK CAGASEERTACVWGPWAGPALTFDDCCCR QPRLGTQCRPCPPRGTSQCPTSQSESNS FWDTSPLLLGKSPREDSSEEDSDECRCV SGRCVPRPGGAVCECPGGFQLDASRARC DIDECRELNQRGLLCKSERCVNTSGSFRC VCKAGFTRSRPHGPACLSAAADDAAIAHT SVIDHRGYFH</p>	
LTBP1S	<i>Cynomolgus</i>	<p>NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCE KGNTTTLISENGHAADTLTATNFRVVLCH LPCMNGGQCSSRDKCQCPNFTGKLCQIP VHGASVPKLYQHSQQPGKALGTHVIHSTH TLPLTVTSQQGVKVKFPPNIVNIHVKHPP EASVQIHQVSRIDGPTGQKTKEAQPGQSQ VSYQGLPVQKTQTIHSTYSHQQVIPHVYP VAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSKQ EDCCGTVGTSWGFNKCQKCPKPSYHGYN QMMECLPGYKRVNNTFCQDINECQLQGV PNGECLNTMGSYRCTCKIGFGPDPTFSSC VPDPPVISEEKGPCYRLVSSGRQCMHPLS VHLTKQLCCCSVGKAWGPHCEKCPLPGTA AFKEICPGMGYTVSGVHRRRPIHHHV GKGPV FVKPKNTQPVAKSTHPPPLPAKEE PV EALTFSREHGPGVAEPEVATAPPEKEI PS LDQEKTKLEPGQPQLSPGISTIHLPQFP VVIEKTSPPVPVEVAPEASTSSASQVIAP TQVTEINECTVNPDICGAGHCINLPVRYT CICYEGYKFSEQQRKCVDIDECTQVQHLC SQGRCENTEGSFLCICPAGFMASEEGTNC IDVDECLRPDVCGEHCVNTVGAFRCEYC</p>	46

		DSGYRMTQRGRCEDIDECLNPSTCPDEQC VNSPGSYQCVPCTEGFRGWNGQCLDVDEC LEPNVCTNGDCSNLEGSYMC SCHKGYTRT PDHKHCKDIDECQQGNLCVNGQCKNTEGS FRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECQHHL CAHGQCRNTEGSFQCVCDQGYRASGLGDH CEDINECLEDKSVQCRGDCINTAGSYDCT CPDGFQLDDNKTCQDINECEHPGLCGPQG ECLNTEGSFHCVCQQGFSISADGRTCEDI DECVNNTVCD SHGFC DNTAGSFRCLCYQG FQAPQDGQGCVDVNECELLSGVCGEAFCE NVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRSRTS TDLDVEQPKEEKKECYYNLNDASLCDNVL APNVTKQECCCTSGAGWGDNCEIFPCPVL GTAEFTMCPKGKGFVPAGESSEAGGEN YKDADECLLFGQEICKNGFCLNTRPGYEC YCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPSSCID GQCVNTEGSYNCFCTHPMVLDA SEKRCIR PAESNEQIEETDVYQDLCWEHLSDEYVCS RPLVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALCP MKDSDDYAQLCNIPVTGRRQPYGRDALVD FSEQYAPEADPYFIQDRFLNSFEELQAE CGILNGCENGRCVRVQEGYTCD CF DGYHL DTAKMTCVDVNECDELNNRMSLCKNAKCI NTEGSYKCLCLPGYVPSDKPNYCTPLNTA LNLEKDS DLE	
LTBP1S	Camundongo	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGNCQNSCQ KGNTTTLISENGHAADTLTATNFRVVICH LPCMNGGQCSSRDKCQCPPNFTGKLCQIP VLGASMPKLYQHAQQQKALGSHVIHSTH TLPLTMTSQQGVKVKFPPNIVNIHVKHPP EASVQIHQVSRIDSPGGQKVKEAQPGQSQ VSYQGLPVQKTQTVHSTYSHQQLIPHVYP VAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSKQ EDCCGTVGT SWGFNKCQKCPKKQSYHGYT QMMECLQGYKRVNNTFCQDINECQLQGV PNGECLNTMGSYRCCKMGFGPDPTFSSC VPDPPVISEEKGPCYRLVSPGRHCMHPLS VH LTKQICCCSVGKAWGPHCEKCPLPGTA AFKEICPGMGYTVSGVHRRRPIHQHIGK EAVYVKPKNTQPVAKSTHPPPLPAKEEPV EALTSSWEHGPRGAEPEVVTAPPEKEIPS LDQEKTRLEPGQPQLSPGVSTIHLHPQFP VVVEKTSPVPVEVAPEASTSSASQVIAP	47

		<p> TQVTEINECTVNPDICGAGHCINLPVRYT CICYEGYKFSEQLRKCVDIDECAQVRHLC SQGRCENTEGSFLCVCAPAGFMASEEGTNC IDVDECLRPDMCRDGRICINTAGAFRCEYC DSGYMSRRGYCEDIDECLKPSTCPEEQC VNTPGSYQCVPCTEGFRGWNGQCLDVDEC LQPKVCTNGSCTNLEGSYMCSCHRGYSPT PDHRHCQDIDECQQGNLCMNGQCRNTDGS FRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECEHHHL CSHGQCRNTEGSFQCVCNQGYRASVLGDH CEDINECLEDSVCQGGDCINTAGSYDCT CPDGFQLNDNKGCDINECAQPGLCGSHG ECLNTQGSFHCVCCEQGFSSISADGRTCEDI DECVNNTVCDSHGFCDNTAGSFRCLCYQG FQAPQDGGQCVDVNECELLSGVCGEAFCE NVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRSRVT EDSGVDRQPREEKKECYYNLNDASLCDNV LAPNVTKQECCCTSGAGWGDNCEIFPCPV QGTAFTTEMCPRGKGLVPAGESSYDTGGE NYKDADECLLFGEIICKNGYCLNTQPGYE CYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPNSCI DGQCVNTEGSYNCFCTHPMVLDASEKRCV QPTESNEQIEETDVYQDLCWEHLSEEYVC SRPLVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALC PMKDSDDYAQLCNIPVTGRRRPYGRDALV DFSEQYGPETDPYFIQDRFLNSFEELQAE ECGILNGCENGRCVRVQEGYTCDCFDGYH LDMAKMTCVDVNECSELNNRMSLCKNAKC INTEGSYKCLCLPGYIPSDKPNYCTPLNS ALNLDKESDLE </p>	
GARP	Camundongo	<p> ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPS VLSLDIQALYLSGNQLQSILVSPLGFYTA LRHLDLSDNQISFLQAGVFQALPYLEHLN LAHNRLATGMALNSGGLGRLPLLVS LDLS GNSLHGNLVERLLGETPRLRTL SLAENSL TRLARHTFWGMPAVEQLDLHSNVLM DIED GAFEALPHLTHLNL SRNSLT CISDFS LQQ LQVLDLSCNSIEAFQTAPEPQAQFQLAWL DLRENKLLHFPDLAVFPRLIYLNVSNNLI QLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSASPLSNPS RNASTHPLSQLLNLDLSYNEIELVPASFL EHLTSLRFLNLSRNCLRSFEARQVDSLPC LVLLDL SHNVLEALELGTKVLGSLQTL LL QDNALQELPPYTFASLASLQRLNLQGNQV </p>	48

		SPCGGPAEPGPPGCVDFSGIPTLHVLNMA GNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLD VATGALVGLEASLEVLELQGNGLTVLRVD LPCFLRLKRLNLAENQLSHLPWTRAVSL EVLDLRNNSFSLLPGNAMGGLETSLRRLY LQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDTQ DLICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKGGLKN VNLILLLSFTLVSAIVLTTLATICFLRRQ KLSQQYKA	
sGARP	Camundongo	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPS VLSDIQALYLSGNQLQSILVSPGLGYTA LRHLDLSDNQISFLQAGVFQALPYLEHLN LAHNRLATGMALNSGGLGRLPLLVSLLDS GNSLHGNLVERLLGETPRLRTLSLAENSL TRLARHTFWGMPAVEQLDLHSNVLMIED GAFEALPHLTHLNLSRNSLTCISDFSQQ LQVLDLSCNSIEAFQTAPEPQAQFQLAWL DLRENKLLHFPDLAVFPRLIYLNVSNNLI QLPAGLPRGSEDLHAPSEGWSASPLSNPS RNASTHPLSQLNLDLSYNEIELVPASFL EHLTSLRFLNLSRNCLRSFEARQVDSLPC LVLLDLSHNVLEALELGTKVLGSLQTLTL QDNALQELPPYTFASLASLQRLNLQGNQV SPCGGPAEPGPPGCVDFSGIPTLHVLNMA GNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLD VATGALVGLEASLEVLELQGNGLTVLRVD LPCFLRLKRLNLAENQLSHLPWTRAVSL EVLDLRNNSFSLLPGNAMGGLETSLRRLY LQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDTQ DLICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKGGLKN VN	49

[146] Em algumas modalidades, complexos antigênicos de proteína (por exemplo, um complexo LTBP-TGFβ1) podem compreender uma ou mais proteínas LTBP (por exemplo, LTBP1, LTBP2, LTBP3 e LTBP4) ou fragmento(s) destas. Em algumas modalidades, um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, como descrito nesse relatório descritivo, é capaz de se ligar a um complexo LTBP1-TGFβ1. Em algumas modalidades, a proteína LTBP1 é uma proteína de ocorrência natural ou fragmento desta. Em algumas modalidades, a proteína LTBP1 é

uma proteína de ocorrência não natural ou fragmento desta. Em algumas modalidades, a proteína LTBP1 é uma proteína recombinante. Essa proteína LTBP1 recombinante pode compreender LTBP1, variantes alternativamente unidas desta e/ou fragmentos desta. Proteínas LTBP1 recombinantes também podem ser modificadas para compreender um ou mais marcadores detectáveis. Em algumas modalidades, a proteína LTBP1 compreende uma sequência-líder (por exemplo, uma sequência-líder nativa ou não nativa). Em algumas modalidades, a proteína LTBP1 não compreende uma sequência-líder (ou seja, a sequência-líder foi processada ou clivada). Esses marcadores detectáveis podem incluir, sem limitação, marcadores de biotina, *tags* de polihistidina, *tags* de myc, *tags* de HA e/ou *tags* fluorescentes. Em algumas modalidades, a proteína LTBP1 é uma proteína LTBP1 de mamífero. Em algumas modalidades, a proteína LTBP1 é uma proteína LTBP1 humana, de macaco, de camundongo ou de rato. Em algumas modalidades, a proteína LTBP1 compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 46 e 47 na Tabela 2. Em algumas modalidades, a proteína LTBP1 compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N^o: 50 na Tabela 3.

[147] Em algumas modalidades, um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, como descrito nesse relatório descritivo, é capaz de se ligar a um complexo LTBP3-TGF β 1. Em algumas modalidades, a proteína LTBP3 é uma proteína de ocorrência natural ou fragmento desta. Em algumas modalidades, a proteína LTBP3 é uma proteína de ocorrência não natural ou fragmento desta. Em algumas modalidades, a proteína LTBP3 é uma proteína recombinante. Essa proteína

LTBP3 recombinante pode compreender LTBP3, variantes alternativamente unidas desta e/ou fragmentos desta. Em algumas modalidades, a proteína LTBP3 compreende uma sequência-líder (por exemplo, uma sequência-líder nativa ou não nativa). Em algumas modalidades, a proteína LTBP3 não compreende uma sequência-líder (ou seja, a sequência-líder foi processada ou clivada). Proteínas LTBP3 recombinantes também podem ser modificadas para compreender um ou mais marcadores detectáveis. Esses marcadores detectáveis podem incluir, sem limitação, marcadores de biotina, *tags* de polihistidina, *tags* de myc, *tags* de HA e/ou *tags* fluorescentes. Em algumas modalidades, a proteína LTBP3 é uma proteína LTBP3 de mamífero. Em algumas modalidades, a proteína LTBP3 é uma proteína LTBP3 humana, de macaco, de camundongo ou de rato. Em algumas modalidades, a proteína LTBP3 compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 44 e 45 na Tabela 2. Em algumas modalidades, a proteína LTBP1 compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N^o: 51 na Tabela 3.

[148] Em algumas modalidades, um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, como descrito nesse relatório descritivo, é capaz de se ligar a um complexo GARP-TGF β 1. Em algumas modalidades, a proteína GARP é uma proteína de ocorrência natural ou fragmento desta. Em algumas modalidades, a proteína GARP é uma proteína de ocorrência não natural ou fragmento desta. Em algumas modalidades, a proteína GARP é uma proteína recombinante. Essa GARP pode ser recombinante, referida nesse relatório descritivo como GARP recombinante. Algumas GARPs recombinantes podem

compreender uma ou mais modificações, truncamentos e/ou mutações, comparadas com GARP do tipo selvagem. GARPs recombinantes podem ser modificadas para serem solúveis. Em algumas modalidades, a proteína GARP compreende uma sequência-líder (por exemplo, uma sequência-líder nativa ou não nativa). Em algumas modalidades, a proteína GARP não compreende uma sequência-líder (ou seja, a sequência-líder foi processada ou clivada). Em outras modalidades, GARPs recombinantes são modificadas para compreender um ou mais marcadores detectáveis. Em modalidades adicionais, esses marcadores detectáveis podem incluir, sem limitação, marcadores de biotina, *tags* de polihistidina, *flag tags*, *tags* de myc, *tags* de HA e/ou *tags* fluorescentes. Em algumas modalidades, a proteína GARP é uma proteína GARP de mamífero. Em algumas modalidades, a proteína GARP é uma proteína GARP humana, de macaco, de camundongo ou de rato. Em algumas modalidades, a proteína GARP compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 48-49 na Tabela 2. Em algumas modalidades, a proteína GARP compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 52 e 53 na Tabela 4. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, descritos nesse relatório descritivo não se ligam a TGFβ1 de forma contexto-dependente, por exemplo, a ligação a TGFβ1 só ocorreria quando a molécula de TGFβ1 estivesse complexada com uma molécula apresentadora específica, por exemplo, GARP. Ao invés disso, os anticorpos, e porções de ligação ao antígeno destes, se ligam a TGFβ1 de uma forma contexto-independente. Em outras palavras, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, se ligam a TGFβ1 quando

ligados a qualquer molécula apresentadora: GARP, LTBP1, LTBP3 e/ou LRCC33.

[149] Em algumas modalidades, um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, como descrito nesse relatório descritivo, é capaz de se ligar a um complexo LRRC33-TGF β 1. Em algumas modalidades, a proteína LRRC33 é uma proteína de ocorrência natural ou fragmento desta. Em algumas modalidades, a proteína LRRC33 é uma proteína de ocorrência não natural ou fragmento desta. Em algumas modalidades, a proteína LRRC33 é uma proteína recombinante. Essa LRRC33 pode ser recombinante, referida nesse relatório descritivo como LRRC33 recombinante. Algumas proteínas LRRC33 recombinantes podem compreender uma ou mais modificações, truncamentos e/ou mutações, comparadas com tipo selvagem LRRC33. Proteínas LRRC33 recombinantes podem ser modificadas para serem solúveis. Por exemplo, em algumas modalidades, o ectodomínio de LRRC33 pode ser expresso com um His-tag no terminal-C a fim de expressar proteína LRRC33 solúvel (sLRRC33; veja, por exemplo, ID. DE SEQ. N°: 84). Em algumas modalidades, a proteína LRRC33 compreende uma sequência-líder (por exemplo, uma sequência-líder nativa ou não nativa). Em algumas modalidades, a proteína LRRC33 não compreende uma sequência-líder (ou seja, a sequência-líder foi processada ou clivada). Em outras modalidades, proteínas LRRC33 recombinantes são modificadas para compreender um ou mais marcadores detectáveis. Em modalidades adicionais, esses marcadores detectáveis podem incluir, sem limitação, marcadores de biotina, tags de polihistidina, flag tags, tags de myc, tags de HA e/ou tags fluorescentes. Em algumas modalidades, a proteína LRRC33 é uma proteína LRRC33 de

mamífero. Em algumas modalidades, a proteína LRRC33 é uma proteína LRRC33 humana, de macaco, de camundongo ou de rato. Em algumas modalidades, a proteína LRRC33 compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 83, 84 e 101 na Tabela 4.

Tabela 3. Sequências de aminoácidos de LTBP exemplares.

Proteína	Sequência	ID. DE SEQ. N°
LTBP1S	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNT TTLISENGHAADTLTATNFRVVICHLPKMNGGQ CSSRDKCQCPNFTGKLCQIPVHGASVPKLYQH SQQPGKALGTHVIHSTHTLPLTVTSQQGVKVKF PPNIVNIHVKHPPPEASVQIHQVSRIDGPTGQKT KEAQPGQSQVSYQGLPVQKTQTIHSTYSHQQVI PHVYPVAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSK QEDCCGTVGTSWGFNKCQKCPKKPSYHGYNQMM ECLPGYKRVNNTFCQDINECQLQGVCPNGECLN TMGSYRCTCKIGFGPDPTFSSCVPDPPVISEEK GPCYRLVSSGRQCMHPLSVHLTKQLCCCSVGKA WGPHCEKCPLPGTAAFKEICPGGMGYTVSGVHR RRPIHHHVKGKPVFVKPKNTQPVAKSTHPPPLP AKEEPVEALTFSREHGGVAEPEVATAPPEKEI PSLDQEKTKLEPGQPQLSPGISTIHLPQFPVV IEKTSPPVPVEVAPEASTSSASQVIAPTQVTEI NECTVNPDICGAGHCINLPVRYTCICYEGYRFS EQQRKCVDIDECTQVQHLCSQGRCENTEGSFLC ICPAGFMASEEGTNCIDVDECLRPDVCGEHCV NTVGAFRCEYCDSGYRMTQRGRCEDIDECLNPS TCPDEQCVNSPGSYQCVPCTEGFRGWNGQCLDV DECLEPNVCANGDCSNLEGSYMCSCHKGYTRTP DHKHCRDIDECQQGNLCVNGQCKNTEGSFRCTC GQGYQLSAAKDQCEDIDECQHRHLCAHGQCRNT EGSFQCVCDQGYRASGLGDHCEIDNECLEDKSV CQRGDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDNKTCQDIN ECEHPGLCGPQGECLNTEGSFHCVCQQGFSISA DGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCDNTAGSFRCL CYQGFQAPQDGGQCVDVNECELLSGVCGEAFCE NVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRSRTSTDLD VDVDQPKEEKKECYNLDASLCDNVLAPNVTK QECCCTSGVGWGDNCEIFPCPVLGTAEFTMCP KGKGFVPAGESSEAGGENYKDADECLLFGQEI	50

	CKNGFCLNTRPGYECYCKQGTYYDPVKLQCFDM DECQDPSSCIDGQCVNTEGSYNCFCTHPMVLD SEKRCIRPAESNEQIEETDVYQDLCWEHLSDEY VCSRPLVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALCPL KDSDDYAQLCNIPVTGRRQPYGRDALVDFSEQY TPEADPYFIQDRFLNSFEELQAEECGILNGCEN GRCVRVQEGYTCDCFDGYHLD TAKMTCVDVNEC DELNNRMSLCKNAKCINTDGSYKCLCLPGYVPS DKPNYCTPLNTALNLEKSDLE	
LTBP 3	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCL KGQCRDSCQQGSNMTLIGENGHSTD TLTGSGFR VVVCPLPCMNGGQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQV PAGGAGGGTGGSGPGLSRTGALSTGALPPLAPE GDSVASKHAIYAVQVIADPPGPGEGPPAQHAAF LVPLGPGQISAEVQAPPPVNVVRVHHPPEASVQ VHRIESSNAESAAPSQHLLPHPKPSHPRPPTQK PLGRCFQDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSI GTAWGQSKCHKCPQLQYTG VQKPGPVRGEVGAD CPQGYKRLNSTHCQDINECAMPGVCRHGDCLNN PGSYRCVCPPGHSLGPSRTQCIADKPEEKSLCF RLVSPHQHCQHPLTTRLTRQLCCCSVGKAWGAR CQRCPTDGTAAFKEICPAGKGYHILTSHQTLTI QGESDFSLFLHPDGPPKPQQLPESPSQAPPPED TEEERGVT TDS PVSEERSVQQSHPTATTT PARP YPELISRPSPTMRWFLPDLPSPRS AVEIAPTQ VTETDECR LNQNICGHGECVPGPPDYSCHCNPG YRSHPQHRYCVDVNECEAEPCGPGRGICMNTGG SYNCHCNRGYRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLC GDGGFCINFPGHYKCNCYPGYRLKASRPPVCED IDECRDPSSCPDGKCNKPGSFKCIACQPGYRS QGGGACRDVNECAEGSPCSPGCENLPGSFRCT CAQGYAPAPDGRSCLDVDECEAGDVCDNGICSN TPGSFQCQCLSGYHLSRDRSHCED IDECDFPAA CIGGDCINTNGSYRCLCPQGHRLVGGRKCQDID ECSQDPSLCLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPT QDQHGCEEVEQPHHKKECYLNFDDTVFCDSVLA TNVTQQECCCSLGAGWDHCEIYPCPVYSSAEF HSLCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRD IDECMLF GSEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLLE CVDVDECLDESNCNRNGVCENTRGGYRC ACTPPA EYSPAQRQCL SPEEMDVDECQDPAACRPGRCVN LPGSYRCECRPPWVPGPSGRDCQLPESPAERAP ERRDVCWSQRGEDGMCAGPLAGPALTFDDCCCR QGRGWAQCRPCPPRGAGSHCPTSQSESNSFWD	51

	TSPLLLKGPPRDEDSSEEDSDECRCVSGRCVPR PGGAVCECPGGFQLDASRARCVDIDECRELNQR GLLCKSERCVNTSGSFRCVCKAGFARSRPHGAC VPQRRR	
--	---	--

Tabela 4 - Sequências de aminoácidos de GARP e LRRC33 exemplares.

Proteína	Sequência	ID. DE SEQ. N°
GARP	AQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTE TLDLSGNQLRSILASPLGFYTALRHLDLSTNEISF LQPGAFQALTHLEHLSLAHNRLAMATASAGGLGP LPRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLA ENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSNVLMDIEDGA FEGLPRLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSC NSIEAFQTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLA ALPRLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGW SALPLSAPSGNASGRPLSQLLNLDLSYNEIELIPD SFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLML LDLSHNALETLELGARALGSLRTHLLQGNALRDLP PYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPGPSGCV AFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFHTPLTELD LSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLAQGNGLMVLO VDLPCFICLKRLNLAENRLSHLPQAVSLEVLD LRNNSFSLLPGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCG NGWLAQLHQGRVDVDATQDLICRFSSQEEVSLSH VRPEDCEKGLKNINLIIILTFILVSAILLTTLAA CCCVRRQKFNQQYKA	52
sGARP	AQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTE TLDLSGNQLRSILASPLGFYTALRHLDLSTNEISF LQPGAFQALTHLEHLSLAHNRLAMATASAGGLGP LPRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLA ENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSNVLMDIEDGA FEGLPRLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSC NSIEAFQTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLA ALPRLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGW SALPLSAPSGNASGRPLSQLLNLDLSYNEIELIPD SFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLML LDLSHNALETLELGARALGSLRTHLLQGNALRDLP PYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPGPSGCV AFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFHTPLTELD LSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLAQGNGLMVLO VDLPCFICLKRLNLAENRLSHLPQAVSLEVLD LRNNSFSLLPGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCG	53

	<p>NGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICRFSSQEEVSLSH VRPEDCEKGGLKNIN</p>	
<p>LRRC33 (também conhecida como NRROS; Nº de Acesso Uniprot Q86YC3)</p>	<p>MELLPLWLCLGFHFLTVGWRNRSGTATAASQGVCK LVGGAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLK TLWNHSLQPYPLLESLSLHSCHLERISRGAFQEQG HLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRRLDLS GNALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDS VFEGLERLRELDLQARNYIFEIEGGAFDGLAELRHL NLAFFNNLPCIVDFGLTRLRLVNLVSYNVLEWFLATG GEAAFELETDLDSHNQLLFFPLLPQYSKLRTLLLR DNNMGFYRDLYNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITT VSLWEEFSSSDLADLRFLDMSQNQFQYLPDGFRLK MPSLSHLNLHQNCLMTLHIREHEPPGALTELDLSH NQLSELHLAPGLASCLGSLRLFNLSNQLLGVPFG LFANARNITTLDMSHNQISLCPLPAASDRVGPPSC VDFRNMASLRSLSLEGCGLGALPDCPFQGTSLTYL DLSSNWGVNLGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHS SFMALDFSGFGNLRDLDLSGNCLTTFFPRFGGSLAL ETDLRRNSLTALPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQNP YDCCGVDGWGALQHGQTVADWAMVTCNLSSKIIRV TELPGGVPRDCKWERLDLGLLYLVILPSCLTLLV ACTVIVLTFKKPLLQVIKSRCHWSSVY * O peptídeo sinalizador nativo é retratado em negrito.</p>	83
<p>LRRC33 solúvel (sLRRC33)</p>	<p>MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLGWRNRSGTATAASQ GVCKLVGGAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDA NPLKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSCHLERISRGAF QEQGHLRSLVLGDNCLSENYEETAAALHALPGLRR LDLSGNALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMR LDDSVFEGLERLRELDLQARNYIFEIEGGAFDGLAE LRHLNLAFFNNLPCIVDFGLTRLRLVNLVSYNVLEWF LATGGEAAFELETDLDSHNQLLFFPLLPQYSKLRT LLLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVAQFLLVDGNVT NITTVSLWEEFSSSDLADLRFLDMSQNQFQYLPDG FLRKMPSLSHNLNLHQNCLMTLHIREHEPPGALTEL DLDSHNQLSELHLAPGLASCLGSLRLFNLSNQLLG VPPGLFANARNITTLDMSHNQISLCPLPAASDRVG PPSCVDFRNMASLRSLSLEGCGLGALPDCPFQGTSL TYLDLSSNWGVNLGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNM GLHSSFMALDFSGFGNLRDLDLSGNCLTTFFPRFGG SLALETDLRRNSLTALPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQNP YDCCGVDGWGALQHGQTVADWAMVTCNLSSK IIRVTELPGGVPRDCKWERLDLGLHHHHHH * O peptídeo sinalizador da cadeia</p>	84

	<p>leve kappa humana modificada é retratado em negrito.</p> <p>** O tag de histidina está sublinhado.</p>	
<p>Quimera de LRRC33-GARP humana</p>	<p><u>MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLGWRNRSGTATAASQ</u> <u>GVCKLVGGAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDA</u> <u>NPLKTLWNHSLQPYPLLESLSLHSCHLERISRGAF</u> <u>QEQGHRLRSLVLGDNCLSENYEETAALHALPGLRR</u> <u>LDLSGNALTEDMAALMLQNLSSLRSVSLAGNTIMR</u> <u>LDDSVFEGLERLRELDLQARNYIFEIEGGAFDGLAE</u> <u>LRHLNLAFNNLPCIVDFGLTRLRLVNLVSYNVLEWF</u> <u>LATGGEEAAFELETDLDSHNQLLFFPLLPQYSKLRT</u> <u>LLLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVAQFLLVDGNVT</u> <u>NITTVSLWEEFSSSDLADLRFLDMSQNFQYLPDG</u> <u>FLRKMPSLSHLNLHQNCLMTLHIREHEPPGALTEL</u> <u>DLSHNQLSELHLAPGLASCLGSLRLFNLSNQLLG</u> <u>VPPGLFANARNITTLDMSHNQISLCPLPAASDRVG</u> <u>PPSCVDFRNMASLRSLSLEGCGLGALPDCPFQGTSL</u> <u>LYLDLSSNWGVNLGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNM</u> <u>GLHSSFMALDFSGFGNLRDLDLSGNCLTTFPRFGG</u> <u>SLALETDLRRNSLTALPQKAVSEQLSRGLRTIYL</u> <u>SQNPYDCCGVDGWGALQHGQTVADWAMVTCNLSSK</u> <u>IIRVTELPGGVPRDCKWERLDLGL</u><u>LIILTFILVS</u> <u>AILLTTLAACCCVRRQKFNQQYKA</u></p> <p>* O peptídeo sinalizador da cadeia leve kappa humana modificada é retratado em negrito.</p> <p>** O ectodomínio de LRRC33 está sublinhado.</p> <p># O domínio transmembrana de GARP está em itálico.</p> <p>## A cauda intracelular de GARP está com sublinhado duplo.</p>	101

Antagonistas de TGFβ1

[150] Para a realização dos métodos da presente invenção, quaisquer agentes inibidores de TGFβ1 adequados podem ser empregados, desde que esses agentes inibam ou antagonizem TGFβ1 através de múltiplos efeitos biológicos (por exemplo, TGFβ1 de várias fontes celulares) com seletividade suficiente para a isoforma TGFβ1. De preferência, esses

agentes inibidores de TGF β 1 não possuem atividades inibidoras mensuráveis em direção a TGF β 2 e TGF β 3 em dosagem que fornece benefícios clínicos (por exemplo, eficácia terapêutica e perfis de toxicidade aceitáveis) quando administrados a seres humanos. Agentes inibidores adequados incluem pequenas moléculas, agentes baseados em ácido nucleico, produtos biológicos (por exemplo, agentes baseados em polipeptídeos como, por exemplo, anticorpos e outros agentes), e quaisquer combinações destes. Em algumas modalidades, esses agentes são anticorpos ou fragmentos destes, como adicionalmente descrito abaixo. Esses incluem anticorpos neutralizantes que se ligam ao fator de crescimento TGF β 1 neutralizando, dessa forma, sua ação.

Anticorpos funcionais que inibem seletivamente TGF β 1

[151] A presente invenção, em um aspecto, engloba o uso de anticorpos funcionais. Como usado nesse relatório descritivo, “um anticorpo funcional” confere uma ou mais atividades biológicas em virtude de sua habilidade para se ligar a um antígeno. Anticorpos funcionais, portanto, incluem aqueles capazes de modular a atividade/função de moléculas-alvo (ou seja, antígeno). Esses anticorpos moduladores incluem anticorpos de *inibição* (ou *anticorpos inibidores*) e anticorpos de *ativação*. A presente revelação inclui anticorpos de TGF β que podem inibir um processo biológico mediado por sinalização de TGF β 1 associado com múltiplos contextos de TGF β 1. Agentes inibidores usados para realização da presente invenção, por exemplo, os anticorpos descritos nesse relatório descritivo, visam ser seletivos para TGF β 1 e não visar ou interferir com TGF β 2 e TGF β 3 quando administrados em uma dose terapeuticamente eficaz (dose na

qual é obtida eficácia suficiente dentro de níveis de toxicidade aceitáveis).

[152] Baseado em reconhecimento prévio pelo requerente da presente revelação (veja PCT/US2017/021972) de que a ausência de especificidade de isoforma de antagonistas de TGF β convencionais pode ser a base da fonte de toxicidades associadas à inibição de TGF β , os presentes inventores buscaram obter ainda inibição de TGF β 1 de amplo espectro para o tratamento de várias doenças que manifestam desregulação multifacetada de TGF β 1 mantendo, ao mesmo tempo, o aspecto de segurança/tolerabilidade de inibidores isoforma-seletivos.

[153] Em um sentido amplo, o termo "anticorpo de inibição" se refere a um anticorpo que antagoniza ou neutraliza a função-alvo, por exemplo, atividade do fator de crescimento. Vantajosamente, os anticorpos inibidores preferidos da presente revelação são capazes de inibir a liberação de fator de crescimento maduro por um complexo latente reduzindo, dessa forma, a sinalização de fator de crescimento. Anticorpos inibidores incluem anticorpos que visam qualquer epítipo que reduz a liberação ou atividade de fator de crescimento quando associado com esses anticorpos. Esses epítipos podem se situar em pró-domínios de proteínas TGF β (por exemplo, TGF β 1), fatores de crescimento ou outros epítipos que levem à atividade reduzida do fator de crescimento quando ligado por anticorpo. Os anticorpos inibidores da presente invenção incluem, sem limitação, anticorpos de inibição de TGF β 1. Em algumas modalidades, os anticorpos inibidores da presente revelação se ligam especificamente a um epítipo combinatório, ou seja, um

epítopo formado por dois ou mais componentes/porções de um antígeno ou complexo antigênico. Por exemplo, um epítopo combinatório pode ser formado por contribuições de múltiplas porções de uma única proteína, ou seja, resíduos de aminoácidos de mais de um segmento não contíguo da mesma proteína. Alternativamente, um epítopo combinatório pode ser formado por contribuições de múltiplos componentes de proteína de um complexo antigênico. Em algumas modalidades, os anticorpos inibidores da presente revelação se ligam especificamente a um epítopo conformacional (ou epítopo conformação-específico), por exemplo, um epítopo que é sensível à estrutura tridimensional (ou seja, conformação) de um antígeno ou complexo antigênico.

[154] Abordagens tradicionais para o antagonismo da sinalização de TGF β foram: i) neutralizar diretamente o fator de crescimento maduro após ele já ter se tornado ativo de modo a depletar ligantes livres (por exemplo, liberados de seu complexo precursor latente) que estão disponíveis para ligação ao receptor; ii) empregar fragmentos de receptor solúvel capazes de sequestrar ligantes livres (por exemplo, as denominadas armadilhas de ligantes); ou, iii) visar seu receptor (ou receptores) da superfície celular para bloquear interações ligante-receptor. Cada uma dessas abordagens convencionais exige que o antagonista compita contra contrapartes endógenas. Além disso, as duas primeiras abordagens (i e ii) acima visam o ligante ativo, que é uma espécie transitória. Portanto, esse antagonista deve ser capaz de vencer a competição cineticamente com o receptor endógeno durante a breve janela temporal. A terceira abordagem pode fornecer um efeito mais durável em comparação,

mas inadvertidamente resulta em efeitos inibidores indesejados (e, portanto, possíveis toxicidades), pois muitos fatores de crescimento (por exemplo, até aproximadamente 20) sinalizam por meio do mesmo receptor (ou receptores).

[155] Para fornecer soluções para essas desvantagens, e habilitar seletividade e ação localizada maiores, o mecanismo de ação preferido subjacente aos anticorpos inibidores, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo, atua a *montante* da ativação de TGF β 1 e interação ligante-receptor. Dessa forma, é contemplado que inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, adequados para a realização da presente invenção devem preferivelmente visar o complexo de TGF β 1 precursor inativo (por exemplo, latente) (por exemplo, um complexo que compreende TGF β 1 pró/Latente) antes de sua ativação, a fim de bloquear a etapa de ativação em sua fonte (por exemplo, em um microambiente de doença). De acordo com modalidades preferidas da invenção, esses inibidores visam complexos de TGF β 1 pró/Latente associados à ECM e/ou aderidos à superfície da célula, e não ligantes livres que estão disponíveis transitoriamente para ligação ao receptor.

[156] Consequentemente, algumas modalidades da presente invenção empregam agentes que se ligam especificamente aos complexos que contêm TGF β 1 inibindo, dessa forma, a função de TGF β 1 de uma forma isoforma-seletiva. Esses agentes são preferivelmente anticorpos que se ligam a um epítipo dentro de um complexo de proteína que compreende TGF β 1 pró/Latente (por exemplo, precursor de TGF β 1 inativo). Em algumas modalidades, o epítipo está disponível para ligação pelo

anticorpo quando o TGF β 1 está presente em dois ou mais dos seguintes: um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e um complexo LRRC33-TGF β 1. Em algumas modalidades, esses anticorpos se ligam a dois ou mais dos complexos que contêm TGF β 1 fornecidos acima (por exemplo, "contexto-permissivos"), enquanto, em outras modalidades, esses anticorpos se ligam a todos os quatro dos complexos que contêm TGF β 1 fornecidos acima (por exemplo, "contexto-independentes"). Em algumas modalidades, qualquer um desses anticorpos pode exibir seletividade diferencial entre espécies. O epítopo pode estar dentro do pró-domínio do complexo de TGF β 1. O epítopo pode ser um epítopo combinatório, de modo que o epítopo seja formado por duas ou mais porções/segmentos (por exemplo, resíduos de aminoácidos) de um ou mais componentes do complexo. O epítopo pode ser um epítopo conformacional, de modo que o epítopo seja sensível a uma estrutura tridimensional particular de um antígeno (por exemplo, o complexo de TGF β 1). Um anticorpo ou um fragmento deste que se liga especificamente a um epítopo conformacional é referido como um anticorpo conformacional ou anticorpo conformação-específico.

[157] Modalidades da presente revelação incluem métodos de utilização de anticorpos de inibição em solução, em cultura de células e/ou em indivíduos para modificar a sinalização de fator de crescimento, incluindo para o objetivo de conferir benefícios clínicos aos pacientes.

[158] Anticorpos exemplares e sequências de ácidos nucleicos correspondentes que codificam os anticorpos úteis para realização da presente invenção incluem uma ou mais das sequências de aminoácidos de CDR mostradas na Tabela 5.

Tabela 5. Regiões determinantes de complementaridade da cadeia pesada (CDRHs) e da cadeia leve (CDRLs), como determinadas usando o esquema de numeração de Kabat são mostradas para os anticorpos Ab1, Ab2 e Ab3.

Anticorpo	Ab1	Ab2	Ab3
CDRH1	SYGMH (ID. DE SEQ. Nº: 1)	SDWIG (ID. DE SEQ. Nº: 2)	NYAMS (ID. DE SEQ. Nº: 85)
CDRH2	VISYDGSNKYYAD SVKG (ID. DE SEQ. Nº: 3)	VIYPGDS DTRYSA SFQG (ID. DE SEQ. Nº: 4)	SISGSGGATYYAD SVKG (ID. DE SEQ. Nº: 86)
CDRH3	DIRPYGDYSAAFD I (ID. DE SEQ. Nº: 5)	AAGIAAAGHVTA DI (ID. DE SEQ. Nº: 6)	ARVSSGHWDYFDY (ID. DE SEQ. Nº: 87)
CDRL1	TGSSGSIASNYVQ (ID. DE SEQ. Nº: 7)	KSSQSVLYSSNNK NYLA (ID. DE SEQ. Nº: 8)	RASQSISSYLN (ID. DE SEQ. Nº: 88)
CDRL2	EDNQRP (ID. DE SEQ. Nº: 9)	WASTRES (ID. DE SEQ. Nº: 10)	SSLQS (ID. DE SEQ. Nº: 89)
CDRL3	QSYDSSNHGGV (ID. DE SEQ. Nº: 11)	QQYYSTPVT (ID. DE SEQ. Nº: 12)	QQSYSAPFT (ID. DE SEQ. Nº: 90)

[159] Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção que se ligam especificamente ao complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 incluem qualquer anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, que compreende uma CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 ou CDRL3, ou combinações destas, como fornecidas para qualquer um dos anticorpos mostrados na Tabela 5. Em algumas modalidades, anticorpos que se ligam especificamente ao complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 incluem a CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1,

CDRL2 e CDRL3 de qualquer um dos anticorpos mostrados na Tabela 5. A presente invenção também fornece qualquer sequência de ácidos nucleicos que codifica uma molécula que compreende uma CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 ou CDRL3 como fornecidas para qualquer um dos anticorpos mostrados na Tabela 5. Domínios de CDR3 da cadeia pesada e leve de anticorpo podem ter um papel particularmente importante na especificidade/afinidade de ligação de um anticorpo para um antígeno. Consequentemente, os anticorpos que se ligam especificamente ao complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 da revelação, ou as moléculas de ácido nucleico que codificam esses anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, podem incluir pelo menos as CDR3s da cadeia pesada e/ou leve dos anticorpos como mostrados na Tabela 5.

[160] Aspectos da invenção estão relacionados a um anticorpo monoclonal, ou porção de ligação ao antígeno deste, que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1, e que compreende seis regiões determinantes de complementaridade (CDRs): CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3.

[161] Em algumas modalidades, CDRH1 compreende uma sequência como apresentada em qualquer um dos IDS. DE SEQ. N^{os}: 1, 2 e 85. Em algumas modalidades, CDRH2 compreende uma sequência como apresentada em qualquer um dos IDS. DE SEQ. N^{os}: 3, 4 e 86. Em algumas modalidades, CDRH3 compreende uma sequência como apresentada em qualquer um dos IDS. DE SEQ. N^{os}: 5, 6 e 87. CDRL1 compreende uma sequência como apresentada em qualquer um dos IDS. DE SEQ. N^{os}: 7, 8 e 88.

Em algumas modalidades, CDRL2 compreende uma sequência como apresentada em qualquer um dos IDS. DE SEQ. N^{os}: 9, 10 e 89. Em algumas modalidades, CDRL3 compreende uma sequência como apresentada em qualquer um dos IDS. DE SEQ. N^{os}: 11, 12 e 90.

[162] Em algumas modalidades (por exemplo, como para o anticorpo Ab1, mostrado na Tabela 5), o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste, que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 compreende: uma CDRH1 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N^o: 1, uma CDRH2 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N^o: 3, uma CDRH3 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N^o: 5, uma CDRL1 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N^o: 7, uma CDRL2 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N^o: 9, e uma CDRL3 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N^o: 11.

[163] Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende uma região determinante de complementaridade 3 (CDR3) que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N^o: 5 e uma região variável da cadeia leve que compreende uma CDR3 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N^o: 11. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende uma região determinante de complementaridade 2 (CDR2) que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ.

Nº: 3 e uma região variável da cadeia leve que compreende uma CDR2 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. Nº: 9. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende uma região determinante de complementaridade 1 (CDR1) que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. Nº: 1 e uma região variável da cadeia leve que compreende uma CDR1 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. Nº: 7.

[164] Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende um domínio variável da cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade para a sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. Nº: 13 e um domínio variável da cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade para a sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. Nº: 14. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende um domínio variável da cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. Nº: 13 e um domínio variável da cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. Nº: 14.

[165] Em algumas modalidades, o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste, que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 compreende uma sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada

codificada por uma sequência de ácidos nucleicos que possui pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade para a sequência de ácidos nucleicos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 91 e uma sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia leve codificada por uma sequência de ácidos nucleicos que possui pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade para a sequência de ácidos nucleicos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 92. Em algumas modalidades, o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende uma sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada codificada pela sequência de ácidos nucleicos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 91 e uma sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia leve codificada pela sequência de ácidos nucleicos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 92.

[166] Em algumas modalidades (por exemplo, como para o anticorpo Ab2, mostrado na Tabela 5), o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste, que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 compreende uma CDRH1 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 2, uma CDRH2 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 3, uma CDRH3 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 6, uma CDRL1 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 8, uma CDRL2 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 10, e uma CDRL3 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 12.

[167] Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende uma CDR3 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 6 e uma região variável da cadeia leve que compreende uma CDR3 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 12. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende uma CDR2 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 4 e uma região variável da cadeia leve que compreende uma CDR2 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 10. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende uma CDR1 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 2 e uma região variável da cadeia leve que compreende uma CDR1 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 8.

[168] Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende um domínio variável da cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade para a sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 15 e um domínio variável da cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade para a sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 16. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende um domínio variável da cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos apresentada no ID.

DE SEQ. N°: 15 e um domínio variável da cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 16.

[169] Em algumas modalidades, o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste, que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 compreende uma sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada codificada por uma sequência de ácidos nucleicos que possui pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade para a sequência de ácidos nucleicos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 93 e uma sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia leve codificada por uma sequência de ácidos nucleicos que possui pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade para a sequência de ácidos nucleicos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 94. Em algumas modalidades, o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende uma sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada codificada pela sequência de ácidos nucleicos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 93 e uma sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia leve codificada pela sequência de ácidos nucleicos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 94.

[170] Em algumas modalidades (por exemplo, como para o anticorpo Ab3, mostrado na Tabela 5), o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste, que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 compreende uma CDRH1 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 85, uma CDRH2 que compreende

uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 86, uma CDRH3 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 87, uma CDRL1 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 88, uma CDRL2 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 89, e uma CDRL3 que compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada no ID. DE SEQ. N°: 90.

[171] Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende uma CDR3 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 87 e uma região variável da cadeia leve que compreende uma CDR3 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 90. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende uma CDR2 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 86 e uma região variável da cadeia leve que compreende uma CDR2 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 89. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende uma CDR1 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 85 e uma região variável da cadeia leve que compreende uma CDR1 que possui a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 88.

[172] Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende um domínio variável da cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade para a sequência de aminoácidos

apresentada no ID. DE SEQ. N°: 95 e um domínio variável da cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade para a sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 97. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende um domínio variável da cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 95 e um domínio variável da cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 97.

[173] Em algumas modalidades, o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste, que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 compreende uma sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada codificada por uma sequência de ácidos nucleicos que possui pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade para a sequência de ácidos nucleicos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 96 e uma sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia leve codificada por uma sequência de ácidos nucleicos que possui pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade para a sequência de ácidos nucleicos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 98. Em algumas modalidades, o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende uma sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada codificada pela sequência de ácidos nucleicos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 96 e uma sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia leve codificada pela sequência de ácidos

nucleicos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 98.

[174] Em alguns exemplos, qualquer um dos anticorpos da revelação que se ligam especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 incluem qualquer anticorpo (incluindo porções de ligação ao antígeno deste) que possui uma ou mais sequências de CDR (por exemplo, CDRH ou CDRL) substancialmente similares a CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e/ou CDRL3. Por exemplo, os anticorpos podem incluir uma ou mais sequências de CDR como mostradas na Tabela 5 (IDS. DE SEQ. N°s: 1-12 e 85-90) contendo até 5, 4, 3, 2 ou 1 variação de resíduos de aminoácidos, comparada com a região CDR correspondente em qualquer um dos IDS. DE SEQ. N°s: 1-12 e 85-90. As sequências de aminoácidos completas para a região variável da cadeia pesada e região variável da cadeia leve dos anticorpos listados na Tabela 5 (por exemplo, Ab1, Ab2 e Ab3), bem como as sequências de ácidos nucleicos que codificam a região variável da cadeia pesada e a região variável da cadeia leve dos anticorpos são fornecidas abaixo:
Ab1 - Sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIRPYGDYSAAFDIWGQGT
LVTVSS (ID. DE SEQ. N°: 13)

Ab1 - Sequência de ácidos nucleicos da região variável da cadeia pesada

GAGGTGCAACTCGTGGAGTCAGGCGGTGGACTTGTTTCAGCCTGGGCGAAGTCTGAGACT
CTCATGTGCAGCAAGTGGATTCACTTTCTCCAGTTACGGCATGCACTGGGTGAGACAGG
CGCCTGGAAAGGGTTTGAATGGGTGCTGTGATCTCTTACGACGGGTCAAACAAATAT
TACGCGGATTTCAGTGAAAGGGCGGTTCACTATTTACGGGATAACTCCAAGAACACCCT

GTATCTGCAGATGAATAGCCTGAGGGCAGAGGACACCGCTGTGTACTATTGTGCCCCGGG
ACATAAGGCCTTACGGCGATTACAGCGCCGCATTTGATATTTGGGGACAAGGCACCCTT
GTGACAGTATCTTCT (ID. DE SEQ. N°: 91)

Ab1 - Sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPSIVIFEDNQRP
SGA PDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYQCQSYDSSNHGGVFGGGTQTLTVL (ID.
DE SEQ. N°: 14)

Ab1 - Sequência de ácidos nucleicos da região variável da cadeia leve

AATTTTATGCTTACCCAACCACATAGTGTGAGTGAGTCTCCCGCAAGACTGTAACAAT
TTCATGTACCGGCAGCAGTGGCTCCATCGCTAGCAATTATGTGCAATGGTACCAACAGC
GCCCCGGGAGCGCACCTTCAATAGTGATATTCGAGGATAACCAACGGCCTAGTGGGGCT
CCCGATAGATTTAGTGGGAGTATAGATAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCTCTCACCATTAG
CGGGCTGAAAACAGAGGATGAAGCCGACTATTACTGCCAAAGCTATGATTCTAGCAACC
ACGGCGGAGTGTTTGGCGGAGGAACACAGCTGACAGTCCTAGG (ID. DE SEQ. N°:
92)

Ab1 - Sequência de aminoácidos da cadeia pesada

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFSSYGMHWRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIRPYGDYSAAFEDIWQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPE
FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (ID. DE SEQ. N°: 15)

Ab1 - Sequência de aminoácidos da cadeia leve

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPSIVIFEDNQRP
SGA PDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYQCQSYDSSNHGGVFGGGTQTLTVLGQPKAA
PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNK

YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (ID. DE SEQ. N°: 16)

Ab2 - Sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada

EVQLVQSGAEMKKPGESLKISCKGSGYNFASDWIGWVRQTPGKGLEWMGVIYPGDS DTR
YSASFQGGVTTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAMYICASAAGIAAAGHVTAFDIWGQGT
MVTVSS (ID. DE SEQ. N°: 17)

Ab2 - Sequência de ácidos nucleicos da região variável da cadeia pesada

GAGGTGCAACTGGTGCAATCCGGAGCCGAGATGAAAAAGCCAGGGGAGAGCCTGAAGAT
CTCTTGTAAGGGCTCTGGCTATAACTTCGCTAGTGATTGGATCGGATGGGTGAGGCAAA
CCCCCGGAAAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGTGATCTACCCCGGCGACTCCGACACACGC
TATAGCGCCTCATTCCAGGGCCAGGTCACCATAAGTGCTGATAAATCAATAAATACAGC
CTACTTGCAATGGTCAAGTCTGAAAGCCTCAGATACTGCCATGTACTATTGTGCCTCTG
CCGCCGGCATTGCCGCGGCCGGTCACGTCACCGCCTTCGACATTTGGGGTCAGGGCACT
ATGGTCACTGTAAGCTCC (ID. DE SEQ. N°: 93)

Ab2 - Sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPVTFGQGKLEIK (ID.
DE SEQ. N°: 18)

Ab2 - Sequência de ácidos nucleicos da região variável da cadeia leve

GACATAGTCATGACCCAGTCACCTGACTCTTTGGCCGTGTCTCTGGGGGAGAGAGCCAC
AATAAATTGCAAGTCATCACAGAGCGTCCTGTACTCCTCCAATAATAAAAATTACCTGG
CCTGGTACCAGCAAAAGCCCGGGCAACCCCCCAAATTGTTGATTTACTGGGCTAGTACA
AGGGAATCTGGAGTGCCAGACCGGTTTTCTGGTTCTGGATCTGGTACTGACTTCACCCT
GACAATCAGCTCCCTGCAGGCCGAAGACGTGGCTGTGTACTATTGTCAGCAGTACTATA
GTACACCAGTTACTTTTCGGCCAAGGCACTAACTCGAAATCAAG (ID. DE SEQ.
N°: 94)

Ab2 - Sequência de aminoácidos da cadeia pesada

EVQLVQSGAEMKKPGESLKISCKSGYNFASDWIGWVRQTPGKGLEWMGVIYPGDS DTR
 YSASFQGGVTTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAMYICASAAGIAAAGHVTAFDIWGGT
 MVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAP
 EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQFNSTYRVSVLT VLVHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
 LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR
 LTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLG (ID. DE SEQ. N°: 19)

Ab2 - Sequência de aminoácidos da cadeia leve

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
 RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCQQYYSTPVTFGQGTKLEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (ID. DE SEQ. N°:
 20)

Ab3 - Sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada

EVQLLES GGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGATY
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSSGHWDFDYWGQGLVTVS
 S (ID. DE SEQ. N°: 95)

Ab3 - Sequência de ácidos nucleicos da região variável da cadeia pesada

GAGGTT CAGCTTCTGGAGAGCGGCGGTGGTCTTGTACAACCTGGAGGATCACTCAGGTT
 GTCATGTGCCGCAAGCGGGTTTACATTCAGGA ACTATGCAATGAGCTGGGTCAGACAGG
 CTCCCGGCAAGGGACTTGAGTGGGTATCTTCCATCAGCGGATCTGGAGGAGCAACATAT
 TATGCAGATAGTGTCAAAGGCAGGTT CACAATAAGCCGCGACAATTCTAAAAATACTCT
 TTATCTTCAAATGAATAGCCTTAGGGCTGAGGATACGGCGGTGTATTATTGTGCCCGCG
 TCTCAAGCGGGCATTGGGACTTCGATTATTGGGGGCAGGGTACTCTGGTTACTGTTTCC
 TCC (ID. DE SEQ. N°: 96)

Ab3 - Sequência de aminoácidos da região variável da cadeia

leve

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSAFPTFGQGTKVEIK (ID. DE
SEQ. N°: 97)

Ab3 - Sequência de ácidos nucleicos da região variável da
cadeia leve

GACATCCAAATGACACAGAGCCCGTCTTCCCTCTCAGCTTCAGTCGGTGATCGAGTGAC
GATTACGTGCCGCGCCAGCCAAAGCATCTCCTCCTATCTTAAGTGGTATCAGCAGAAAC
CCGGAAGGCCCAAGTTGCTTATTTACGACGCATCCTCCCTTCAATCTGGTGTGCCC
AGCAGGTTCTCAGGCAGCGGTTTACGGAACGGATTTTACTCTTACCATTTCTAGTCTTCA
ACCTGAGGATTTTTCGACGTATTACTGTCAACAGAGCTACAGTGCGCCGTTACCTTTG
GGCAGGGTACTAAGGTTGAGATAAAGC (ID. DE SEQ. N°: 98)

Ab3 - Sequência de aminoácidos da cadeia pesada

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGATY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSSGHWFDFYWGQGLVTVS
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDK
SRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGL (ID. DE SEQ. N°: 99)

Ab3 - Sequência de aminoácidos da cadeia leve

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSAFPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
LTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (ID. DE SEQ. N°: 100)

[175] Em algumas modalidades, anticorpos da revelação que se ligam especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e um complexo LRRC33-TGF β 1 incluem qualquer anticorpo que inclui um

domínio variável da cadeia pesada do ID. DE SEQ. N°: 13, 17 ou 95, ou um domínio variável da cadeia leve do ID. DE SEQ. N°: 14, 18 ou 97. Em algumas modalidades, anticorpos da revelação que se ligam especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e um complexo LRRC33-TGF β 1 incluem qualquer anticorpo que inclui os pares variáveis da cadeia pesada e variáveis da cadeia leve dos IDS. DE SEQ. N°s: 13 e 14; 17 e 18; e 95 e 97.

[176] Aspectos da revelação fornecem anticorpos que se ligam especificamente a dois ou mais dos seguintes complexos: um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e um complexo LRRC33-TGF β 1, que possui uma sequência de aminoácidos variável da cadeia pesada e/ou uma sequência de aminoácidos variável da cadeia leve homóloga a qualquer uma daquelas descritas nesse relatório descritivo. Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e um complexo LRRC33-TGF β 1 compreende uma sequência variável da cadeia pesada ou uma sequência variável da cadeia leve que é pelo menos 75% (por exemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) idêntica à sequência de aminoácidos variável da cadeia pesada do ID. DE SEQ. N°: 13, 17 ou 95, ou uma sequência variável da cadeia leve do ID. DE SEQ. N°: 14, 18 ou 97. Em algumas modalidades, as sequências de aminoácidos variáveis da cadeia pesada e/ou as sequências de aminoácidos variáveis da cadeia leve homólogas não variam dentro de qualquer uma das sequências de CDR fornecidas neste relatório descritivo. Por exemplo, em algumas modalidades, o grau de variação de sequência (por

exemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) pode ocorrer dentro de uma sequência de aminoácidos variável da cadeia pesada e/ou uma sequência de aminoácidos variável da cadeia leve, excluindo qualquer uma das sequências de CDR fornecidas neste relatório descritivo.

[177] Em algumas modalidades, anticorpos da revelação que se ligam especificamente a dois ou mais de: um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e um complexo LRRC33-TGF β 1 incluem qualquer anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, que inclui uma cadeia pesada do ID. DE SEQ. N°: 15 ou 19, ou uma cadeia leve do ID. DE SEQ. N°: 16 ou 20. Em algumas modalidades, anticorpos da revelação que se ligam especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 incluem qualquer anticorpo que inclui os pares de cadeia pesada e cadeia leve dos IDS. DE SEQ. N°s: 15 e 16; ou 19 e 20.

[178] Aspectos da revelação fornecem anticorpos que se ligam especificamente a dois ou mais de: um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e um complexo LRRC33-TGF β 1 que possui uma sequência de aminoácidos da cadeia pesada e/ou uma sequência de aminoácidos da cadeia leve homóloga a qualquer uma daquelas descritas nesse relatório descritivo. Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 compreende uma sequência da cadeia pesada ou uma sequência da cadeia leve que é pelo menos 75% (por exemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%,

85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) idêntica à sequência da cadeia pesada do ID. DE SEQ. N°: 15 ou 19, ou uma sequência de aminoácidos da cadeia leve do ID. DE SEQ. N°: 16 ou 20. Em algumas modalidades, as sequências de aminoácidos da cadeia pesada e/ou as sequências de aminoácidos da cadeia leve homólogas não variam dentro de qualquer uma das sequências de CDR fornecidas neste relatório descritivo. Por exemplo, em algumas modalidades, o grau de variação de sequência (por exemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) pode ocorrer dentro de uma sequência de aminoácidos da cadeia pesada e/ou uma sequência de aminoácidos da cadeia leve, excluindo qualquer uma das sequências de CDR fornecidas neste relatório descritivo.

[179] Em algumas modalidades, anticorpos da revelação que se ligam especificamente a dois ou mais de: um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 incluem qualquer anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, que inclui uma cadeia pesada do ID. DE SEQ. N°: 15 ou 19, ou uma cadeia leve do ID. DE SEQ. N°: 16 ou 20. Em algumas modalidades, anticorpos da revelação que se ligam especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 incluem qualquer anticorpo que inclui os pares de cadeia pesada e cadeia leve dos IDS. DE SEQ. N°s: 15 e 16; ou 19 e 20.

[180] Aspectos da revelação fornecem anticorpos que se ligam especificamente a dois ou mais de: um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou

um complexo LRRC33-TGF β 1 que possui uma sequência de aminoácidos da cadeia pesada e/ou uma sequência de aminoácidos da cadeia leve homóloga a qualquer uma daquelas descritas nesse relatório descritivo. Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 compreende uma sequência da cadeia pesada ou uma sequência da cadeia leve que é pelo menos 75% (por exemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) idêntica à sequência da cadeia pesada do ID. DE SEQ. N°: 15 ou 19, ou uma sequência de aminoácidos da cadeia leve do ID. DE SEQ. N°: 16 ou 20. Em algumas modalidades, as sequências de aminoácidos da cadeia pesada e/ou as sequências de aminoácidos da cadeia leve homólogas não variam dentro de qualquer uma das sequências de CDR fornecidas neste relatório descritivo. Por exemplo, em algumas modalidades, o grau de variação de sequência (por exemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) pode ocorrer dentro de uma sequência de aminoácidos da cadeia pesada e/ou uma sequência de aminoácidos da cadeia leve excluindo qualquer uma das sequências de CDR fornecidas neste relatório descritivo.

[181] Em algumas modalidades, a "identidade percentual" de duas sequências de aminoácidos é determinada usando o algoritmo de Karlin e Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2.264-68, 1990, modificado como em Karlin e Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5.873-77, 1993. Um algoritmo desse tipo é incorporado nos programas NBLAST e XBLAST

(versão 2.0) de Altschul, e cols. *J. Mol. Biol.* 215: 403-10, 1990. Pesquisas de proteína por BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, pontuação = 50, comprimento de palavra = 3 para obter sequências de aminoácidos homólogas às moléculas de proteína de interesse. Quando existirem lacunas entre duas sequências, Gapped BLAST pode ser utilizado como descrito em Altschul e cols., *Nucleic Acids Res.* 25 (17): 3.389-3.402, 1997. Quando são utilizados os programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros-padrão dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados.

[182] Em qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno descritos nesse relatório descritivo, uma ou mais mutações conservativas podem ser introduzidas nas CDRs ou sequências *framework* em posições onde os resíduos provavelmente não estão envolvidos em uma interação anticorpo-antígeno. Em algumas modalidades, essa mutação (mutações) conservativa pode ser introduzida nas CDRs ou sequências *framework* em uma posição (ou posições) onde os resíduos provavelmente não estão envolvidos na interação com um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e um complexo LRRC33-TGF β 1, como determinado com base na estrutura cristal. Em algumas modalidades, a interface provável (por exemplo, resíduos envolvidos em uma interação antígeno-anticorpo) pode ser deduzida a partir de informação estrutural conhecida em outro antígeno que compartilha similaridades estruturais.

[183] Como usada nesse relatório descritivo, uma "substituição de aminoácido conservativa" se refere a uma substituição de aminoácido que não altera as características relativas de carga ou tamanho da proteína na qual a

substituição de aminoácido é feita. Variantes podem ser preparadas de acordo com métodos para alteração de sequências de polipeptídeos conhecidos por aqueles habilitados na técnica, bem como os que podem ser encontrados em referências que compilam esses métodos, por exemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", J. Sambrook, e cols., eds., Segunda Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova York, 1989, ou "Current Protocols in Molecular Biology", F.M. Ausubel, e cols., eds., John Wiley & Sons, Inc., Nova York. Substituições de aminoácidos conservativas incluem substituições feitas entre aminoácidos dentro dos seguintes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; e (g) E, D.

[184] Em algumas modalidades, os anticorpos fornecidos neste relatório descritivo compreendem mutações que conferem propriedades desejáveis aos anticorpos. Por exemplo, para evitar complicações potenciais em função da troca do braço de Fab, que sabidamente ocorre com mAbs IgG4 nativos, os anticorpos fornecidos neste relatório descritivo podem compreender uma mutação estabilizadora 'Adair' (Angal e cols., "A Single Amino Acid Substitution Abolishes the Heterogeneity of Chimeric Mouse/Human (IgG4) Antibody", *Mol. Immunol.* 30, 105-108; 1993), em que serina 228 (numeração de EU; resíduo 241 na numeração de Kabat) é convertida em prolina resultando em uma sequência de dobradiça IgG1-like (CPPCP (ID. DE SEQ. N°: 54)). Consequentemente, qualquer um dos anticorpos pode incluir uma mutação estabilizadora 'Adair' ou a sequência de aminoácidos CPPCP (ID. DE SEQ. N°: 54).

[185] Os inibidores isoforma-específicos, contexto-

permissivos (que englobam inibidores contexto-independentes) de TGF β 1 da presente revelação, por exemplo, anticorpos que se ligam especificamente a dois ou mais de: um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e um complexo LRRC33-TGF β 1, podem opcionalmente compreender regiões constantes de anticorpo ou partes destas. Por exemplo, um domínio VL pode ser anexado em sua extremidade do terminal-C a um domínio constante da cadeia leve como C κ ou C λ . Similarmente, um domínio VH ou porção deste pode ser anexado a toda ou parte de uma cadeia pesada como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e qualquer subclasse de isótipo. Anticorpos podem incluir regiões constantes adequadas (veja, por exemplo, Kabat e cols., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", No. 91-3242, "National Institutes of Health Publications", Bethesda, Md. (1991)). Portanto, anticorpos dentro do escopo dessa revelação incluem domínios VH e VL, ou uma porção de ligação ao antígeno destes, combinados com quaisquer regiões constantes adequadas.

[186] Adicionalmente ou alternativamente, esses anticorpos podem ou não incluir a região *framework* dos anticorpos dos IDS. DE SEQ. N $^{\circ}$ s: 13-20. Em algumas modalidades, anticorpos que se ligam especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 são anticorpos murídeos e incluem sequências da região *framework* murídeas.

[187] Em algumas modalidades, esses anticorpos se ligam a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 com afinidade relativamente alta, por exemplo, com uma KD menor do que 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M ou menos.

Por exemplo, esses anticorpos podem se ligar a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 com uma afinidade entre 5 pM e 500 nM, por exemplo, entre 50 pM e 100 nM, por exemplo, entre 500 pM e 50 nM. A revelação também inclui anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno que competem com qualquer um dos anticorpos descritos nesse relatório descritivo para ligação a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 e que possuem uma afinidade de 50 nM ou menor (por exemplo, 20 nM ou menor, 10 nM ou menor, 500 pM ou menor, 50 pM ou menor, ou 5 pM ou menor). A afinidade e cinética de ligação dos anticorpos que se ligam especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 podem ser testadas usando qualquer método adequado incluindo, sem limitação, tecnologia de biossensor (por exemplo, OCTET ou BIACORE).

[188] Em algumas modalidades, inibidores de TGF β 1 associado à célula (por exemplo, TGF β 1 apresentado por GARP e TGF β 1 apresentado por LRRC33) de acordo com a invenção incluem anticorpos ou fragmentos destes que se ligam especificamente a esse complexo (por exemplo, GARP-TGF β 1 pró/Latente e LRRC33-TGF β 1 pró/Latente) e desencadeiam a internalização do complexo. Esse modo de ação causa a remoção ou depleção dos complexos de TGF β 1 inativos da superfície da célula (por exemplo, Treg, macrófagos etc.) reduzindo, dessa forma, TGF β 1 disponível para ativação. Em algumas modalidades, esses anticorpos ou fragmentos destes se ligam ao complexo-alvo de uma forma pH-dependente, de modo que a

ligação ocorra em pH neutro ou fisiológico, mas o anticorpo se dissocia de seu antígeno em um pH ácido. Esses anticorpos ou fragmentos destes podem funcionar como anticorpos de reciclagem.

Polipeptídeos

[189] Alguns aspectos da revelação estão relacionados a um polipeptídeo que possui uma sequência selecionada do grupo que consiste no ID. DE SEQ. N°: 13, ID. DE SEQ. N°: 17, ID. DE SEQ. N°: 95, ID. DE SEQ. N°: 15 e ID. DE SEQ. N°: 19. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um domínio variável da cadeia pesada ou um domínio da cadeia pesada. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é pelo menos 75% (por exemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) idêntico a qualquer uma das sequências de aminoácidos apresentadas no ID. DE SEQ. N°: 13, ID. DE SEQ. N°: 17, ID. DE SEQ. N°: 95, ID. DE SEQ. N°: 15 e ID. DE SEQ. N°: 19.

[190] Alguns aspectos da revelação estão relacionados a um polipeptídeo que possui uma sequência selecionada do grupo que consiste no ID. DE SEQ. N°: 14, ID. DE SEQ. N°: 18, ID. DE SEQ. N°: 97, ID. DE SEQ. N°: 16 e ID. DE SEQ. N°: 20. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um domínio variável da cadeia leve ou um domínio da cadeia leve. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é pelo menos 75% (por exemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) idêntico a qualquer uma das sequências de aminoácidos apresentadas no ID. DE SEQ. N°: 14, ID. DE SEQ. N°: 18, ID. DE SEQ. N°: 97, ID. DE SEQ. N°: 16 e ID. DE SEQ. N°: 20.

Anticorpos que competem com anticorpos de inibidores de TGFβ1

isoforma-específicos, contexto-permissivos

[191] Aspectos da revelação estão relacionados a anticorpos que competem ou competem de forma cruzada com qualquer um dos anticorpos fornecidos neste relatório descritivo. O termo "competem", como usado nesse relatório descritivo com relação a um anticorpo, significa que um primeiro anticorpo se liga a um epítopo (por exemplo, um epítopo de um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1) de uma forma suficientemente similar à ligação de um segundo anticorpo, de modo que o resultado da ligação do primeiro anticorpo com seu epítopo é diminuída de forma detectável na presença do segundo anticorpo, comparada com a ligação do primeiro anticorpo na ausência do segundo anticorpo. A alternativa, em que a ligação do segundo anticorpo ao seu epítopo também é diminuída de forma detectável na presença do primeiro anticorpo, pode, não necessariamente, ser o caso. Ou seja, um primeiro anticorpo pode inibir a ligação de um segundo anticorpo ao seu epítopo sem que o segundo anticorpo iniba a ligação do primeiro anticorpo ao seu respectivo epítopo. No entanto, quando cada anticorpo inibe de forma detectável a ligação do outro anticorpo com seu epítopo ou ligante, seja na mesma extensão, em uma extensão maior ou menor, considera-se que os anticorpos "competem de forma cruzada" entre eles pela ligação de seu(s) respectivo(s) epítopo(s). Anticorpos que competem e que competem de forma cruzada estão dentro do escopo dessa revelação. Independentemente do mecanismo pelo qual essa competição ou competição cruzada ocorre (por exemplo, impedimento estérico, alteração conformacional, ou ligação a um epítopo

comum, ou porção deste), aqueles habilitados na técnica observariam que esses anticorpos que competem e/ou que competem de forma cruzada estão englobados e podem ser úteis para os métodos e/ou composições fornecidas neste relatório descritivo.

[192] Aspectos da revelação estão relacionados a anticorpos que competem ou competem de forma cruzada com qualquer um dos anticorpos específicos, ou porções de ligação ao antígeno destes, como fornecidos neste relatório descritivo. Em algumas modalidades, um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, se liga no mesmo epítopo ou perto do mesmo epítopo que qualquer um dos anticorpos fornecidos neste relatório descritivo. Em algumas modalidades, um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, se liga perto de um epítopo se ele se liga dentro de 15 ou menos resíduos de aminoácidos do epítopo. Em algumas modalidades, qualquer um dos anticorpos, ou porção de ligação ao antígeno destes, como fornecidos neste relatório descritivo, se liga dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 resíduos de aminoácidos de um epítopo que é ligado por qualquer um dos anticorpos fornecidos neste relatório descritivo.

[193] Em outra modalidade, é fornecido neste relatório descritivo um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, que compete ou compete de forma cruzada pela ligação a qualquer um dos antígenos fornecidos neste relatório descritivo (por exemplo, um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1) com uma constante de dissociação no equilíbrio, KD, entre o anticorpo e a proteína de menos do

que 10^{-6} M. Em outras modalidades, um anticorpo compete ou compete de forma cruzada pela ligação a qualquer um dos antígenos fornecidos neste relatório descritivo com uma KD em uma faixa de 10^{-11} M a 10^{-6} M. Em algumas modalidades, é fornecido neste relatório descritivo um anticorpo anti-TGF β 1, ou porção de ligação ao antígeno deste, que compete pela ligação com um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, descrito nesse relatório descritivo. Em algumas modalidades, é fornecido neste relatório descritivo um anticorpo anti-TGF β 1, ou porção de ligação ao antígeno deste, que se liga ao mesmo epítipo que um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, descrito nesse relatório descritivo.

[194] Qualquer um dos anticorpos fornecidos neste relatório descritivo pode ser caracterizado usando quaisquer métodos adequados. Por exemplo, um método é identificar o epítipo ao qual o antígeno se liga, ou "mapeamento de epítipo". Há muitos métodos adequados para mapeamento e caracterização da localização de epítopos em proteínas, incluindo a solução da estrutura cristal de um complexo anticorpo-antígeno, ensaios de competição, ensaios de expressão de fragmento de gene e ensaios baseados em peptídeo sintético, como descrito, por exemplo, no Capítulo 11 de Harlow e Lane, "Using Antibodies, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. Em um exemplo adicional, o mapeamento de epítipo pode ser usado para determinar a sequência à qual um anticorpo se liga. O epítipo pode ser um epítipo linear, ou seja, contido em um trecho único de aminoácidos, ou um epítipo conformacional formado por uma interação tridimensional de

aminoácidos que podem não estar necessariamente contidos em um trecho único (estrutura primária linear sequência). Em algumas modalidades, o epítopo é um epítopo de TGF β 1 que só está disponível para ligação pelo anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, descrito nesse relatório descritivo, quando o TGF β 1 está em um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1. Peptídeos de comprimentos variáveis (por exemplo, pelo menos 4-6 aminoácidos de comprimento) podem ser isolados ou sintetizados (por exemplo, recombinantemente) e usados para ensaios de ligação com um anticorpo. Em outro exemplo, o epítopo ao qual o anticorpo se liga pode ser determinado em uma avaliação sistemática por utilização de peptídeos sobrepostos derivados da sequência do antígeno-alvo e determinação da ligação pelo anticorpo. De acordo com os ensaios de expressão de fragmento de gene, o quadro de leitura aberta que codifica o antígeno-alvo é fragmentado aleatoriamente ou por construções genéticas específicas e a reatividade dos fragmentos expressos do antígeno com o anticorpo a ser testado é determinada. Os fragmentos de gene podem ser produzidos, por exemplo, por PCR e depois transcritos e traduzidos em proteína *in vitro*, na presença de aminoácidos radioativos. A ligação do anticorpo aos fragmentos de antígeno marcados radioativamente é então determinada por imunoprecipitação e eletroforese em gel. Certos epítopos também podem ser identificados por utilização de grandes bibliotecas de sequências peptídicas aleatórias exibidas na superfície de partículas de fago (bibliotecas de fago). Alternativamente, uma biblioteca definida de fragmentos peptídicos sobrepostos

pode ser testada para a ligação ao anticorpo de teste em ensaios de ligação simples. Em um exemplo adicional, a mutagênese de um domínio de ligação ao antígeno, experimentos de troca de domínios e mutagênese por varredura de alanina podem ser realizados para identificar resíduos exigidos, suficientes e/ou necessários para ligação do epítopo. Por exemplo, experimentos de troca de domínios podem ser realizados usando um mutante de um antígeno-alvo no qual vários fragmentos do complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 foram substituídos (trocados) com sequências de uma proteína intimamente relacionada, mas antigenicamente distinta, por exemplo, outro membro da família de proteína TGF β (por exemplo, GDF11). Por avaliação da ligação do anticorpo ao mutante de um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1, a importância do fragmento de antígeno particular para ligação do anticorpo pode ser avaliada.

[195] Alternativamente, podem ser realizadas ensaios de competição usando outros anticorpos que sabidamente se ligam ao mesmo antígeno para determinar se um anticorpo se liga ao mesmo epítopo que os outros anticorpos. Ensaios de competição são bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica.

[196] Além disso, a interação de qualquer um dos anticorpos fornecidos neste relatório descritivo com um ou mais resíduos em um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 pode ser determinada por tecnologia de rotina. Por exemplo, uma estrutura cristal pode ser determinada, e as distâncias entre os resíduos em um complexo GARP-TGF β 1, um complexo

LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 e um ou mais resíduos no anticorpo podem ser determinadas conseqüentemente. Com base nessa distância, pode ser determinado se um resíduo específico em um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 interage com um ou mais resíduos no anticorpo. Além disso, métodos adequados, por exemplo, ensaios de competição e ensaios de mutagênese do alvo, podem ser aplicados para determinar a ligação preferencial de um anticorpo candidato.

Diversas modificações e variações de anticorpos

[197] Variações, modificações e características não limitantes de qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno destes englobados pela presente revelação são brevemente discutidas abaixo. Modalidades de métodos analíticos relacionados, também são fornecidas.

[198] Unidades estruturais de anticorpo de ocorrência natural tipicamente compreendem um tetrâmero. Cada um desses tetrâmeros tipicamente é composto por dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, cada par tendo uma cadeia "leve" de comprimento total (em certas modalidades, cerca de 25 kDa) e uma cadeia "pesada" de comprimento total (em certas modalidades, cerca de 50-70 kDa). A porção do terminal amino de cada cadeia tipicamente inclui uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos que tipicamente é responsável pelo reconhecimento de antígeno. A porção do terminal carboxi de cada cadeia tipicamente define uma região constante que pode ser responsável pela função efetora. Cadeias leves de anticorpo humano tipicamente são classificadas como cadeias leves kappa e lambda. As cadeias

pesadas são tipicamente classificadas como mu, delta, gama, alfa ou épsilon, e definem o isótipo do anticorpo. Um anticorpo pode ser de qualquer tipo (por exemplo, IgM, IgD, IgG, IgA, IgY e IgE) e classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM1, IgM2, IgA1 e IgA2). Dentro das cadeias leves e pesadas de comprimento total, tipicamente, as regiões variáveis e constantes são unidas por uma região "J" de cerca de 12 ou mais aminoácidos, com a cadeia pesada também incluindo uma região "D" de cerca de mais 10 aminoácidos (veja, por exemplo, "Fundamental Immunology", Capítulo 7 (Paul, W., ed., 2ª Edição, Raven Press, N.Y. (1989)) (incorporado por referência em sua totalidade)). As regiões variáveis de cada par de cadeias leves/pesadas tipicamente formam um sítio de ligação ao antígeno.

[199] As regiões variáveis tipicamente exibem a mesma estrutura geral de regiões *framework* (FR) relativamente conservadas unidas por três regiões hipervariáveis, também denominadas regiões determinantes de complementaridade ou CDRs. As CDRs das duas cadeias de cada par tipicamente são alinhadas pelas regiões *framework*, o que pode permitir a ligação a um epítopo específico. Do terminal-N para o terminal-C, ambas as regiões variáveis da cadeia leve e pesada tipicamente compreendem os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. A designação de aminoácidos para cada domínio está tipicamente de acordo com as definições de "Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest" ("National Institutes of Health", Bethesda, Md. (1987 e 1991)), ou Chothia & Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Chothia e cols. (1989) *Nature* 342: 878-883. As CDRs de uma cadeia leve também podem ser referidas como CDR-L1, CDR-L2

e CDR-L3, e as CDRs de uma cadeia pesada também podem ser referidas como CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3. Em algumas modalidades, um anticorpo pode compreender um pequeno número de deleções de aminoácidos da extremidade carboxi da cadeia (ou cadeias) pesada. Em algumas modalidades, um anticorpo compreende uma cadeia pesada que possui 1-5 deleções de aminoácidos na extremidade carboxi da cadeia pesada. Em certas modalidades, a delineação definitiva de uma CDR e a identificação de resíduos que compreendem o sítio de ligação de um anticorpo é obtida por solução da estrutura do anticorpo e/ou solução da estrutura do complexo anticorpo-ligante. Em certas modalidades, isso pode ser obtido por qualquer uma de diversas metodologias conhecidas por aqueles habilitados na técnica, por exemplo, cristalografia de raios-X. Em algumas modalidades, vários métodos de análise podem ser empregados para identificar ou aproximar as regiões CDR. Exemplos desses métodos incluem, sem limitação, a definição de Kabat, a definição de Chothia, a definição de AbM e a definição de contato.

[200] Um anticorpo com "afinidade maturada" é um anticorpo com uma ou mais alterações em uma ou mais CDRs deste, que resultam em um aumento na afinidade do anticorpo pelo antígeno, comparado com um anticorpo parental, que não possui aquela alteração(ões). Anticorpos com afinidade maturada exemplares terão afinidades nanomolares ou até mesmo picomolares pelo antígeno-alvo. Anticorpos com afinidade maturada são produzidos por procedimentos conhecidos na técnica. Marks e cols. (1992) *Bio/Technology* 10: 779-783 descreve a maturação da afinidade por embaralhamento do domínio VH e VL. A mutagênese aleatória de

CDR e/ou resíduos *framework* é descrita por Barbas, e cols. (1994) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 3.809-3.813; Schier e cols. (1995) *Gene* 169: 147-155; Yelton e cols., (1995) *J. Immunol.* 155: 1.994-2.004; Jackson e cols. (1995) *J. Immunol.* 154 (7): 3.310-9; e Hawkins e cols. (1992) *J. Mol. Biol.* 226: 889-896; e a mutação seletiva em posições de mutagênese seletivas, posições de contato ou hipermutação com um resíduo de aminoácido que aumenta a atividade é descrita na Patente U.S. Nº 6.914.128.

[201] O termo "anticorpo com CDR enxertada" se refere aos anticorpos que compreendem sequências da região variável da cadeia pesada e leve de uma espécie, mas nos quais as sequências de uma ou mais das regiões CDR de VH e/ou VL são substituídas com sequências de CDR de outra espécie, por exemplo, anticorpos que possuem regiões variáveis da cadeia pesada e leve muríneas nas quais uma ou mais das CDRs muríneas (por exemplo, CDR3) foram substituídas com sequências de CDR humana.

[202] O termo "anticorpo quimérico" se refere aos anticorpos que compreendem sequências da região variável da cadeia pesada e leve de uma espécie e sequências da região constante de outra espécie, tais como anticorpos que possuem regiões variáveis da cadeia pesada e leve muríneas ligadas a regiões constantes humanas.

[203] Como usado nesse relatório descritivo, o termo "*framework*" ou "sequência *framework*" se refere às sequências restantes de uma região variável menos as CDRs. Como a definição exata de uma sequência de CDR pode ser determinada por sistemas diferentes, conseqüentemente o significado de uma sequência *framework* está sujeito a diferentes

interpretações. As seis CDRs (CDR-L1, -L2 e -L3 da cadeia leve e CDR-H1, -H2 e -H3 da cadeia pesada) também dividem as regiões *framework* na cadeia leve e na cadeia pesada em quatro subregiões (FR1, FR2, FR3 e FR4) em cada cadeia, nas quais CDR1 está posicionada entre FR1 e FR2, CDR2 entre FR2 e FR3, e CDR3 entre FR3 e FR4. Sem especificar as subregiões particulares como FR1, FR2, FR3 ou FR4, uma região *framework*, como referida por outros, representa as FRs combinadas dentro da região variável de uma única cadeia de imunoglobulina de ocorrência natural. Como usada nesse relatório descritivo, uma FR representa uma das quatro subregiões, e FRs representam duas ou mais das quatro subregiões que constituem uma região *framework*.

[204] Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende um domínio constante da cadeia pesada de imunoglobulina de um domínio constante de IgM humana, um domínio constante de IgG humana, um domínio constante de IgG1 humana, um domínio constante de IgG2 humana, um domínio constante de IgG2A humana, um domínio constante de IgG2B humana, um domínio constante de IgG2 humana, um domínio constante de IgG3 humana, um domínio constante de IgG3 humana, um domínio constante de IgG4 humana, um domínio constante de IgA humana, um domínio constante de IgA1 humana, um domínio constante de IgA2 humana, um domínio constante de IgD humana ou um domínio constante de IgE humana. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende um domínio constante da cadeia pesada de imunoglobulina de um domínio constante de IgG1 humana ou um domínio constante de IgG4 humana. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de

ligação ao antígeno deste, compreende um domínio constante da cadeia pesada de imunoglobulina de um domínio constante de IgG4 humana. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, compreende um domínio constante da cadeia pesada de imunoglobulina de um domínio constante de IgG4 humana que possui uma substituição do arcabouço de Ser para Pro que produz uma dobradiça IgG1-like e permite a formação de ligações dissulfeto intercadeias.

[205] Em algumas modalidades, o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste, ainda compreende um domínio constante da cadeia leve de imunoglobulina que compreende um domínio constante lambda de Ig humana ou um domínio constante kappa de Ig humana.

[206] Em algumas modalidades, o anticorpo é uma IgG que possui quatro cadeias polipeptídicas que são duas cadeias pesadas e duas cadeias leves.

[207] Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo humanizado, um *diabody* ou um anticorpo quimérico. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo humano. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma *framework* que possui uma sequência de aminoácidos da linhagem germinativa humana.

[208] Em algumas modalidades, a porção de ligação ao antígeno é um fragmento Fab, um fragmento F(ab')₂, um fragmento scFab ou um fragmento scFv.

[209] Como usado nesse relatório descritivo, o termo "gene de anticorpo de linhagem germinativa" ou "fragmento gênico" se refere a uma sequência de imunoglobulina codificada por células não linfóides que não passou pelo

processo de maturação que leva ao rearranjo genético e mutação para expressão de uma imunoglobulina particular (veja, por exemplo, Shapiro e cols. (2002) *Crit. Rev. Immunol.* 22 (3): 183-200; Marchalonis e cols. (2001) *Adv. Exp. Med. Biol.* 484: 13-30). Uma das vantagens fornecidas por várias modalidades da presente revelação é decorrente do reconhecimento de que genes de anticorpo da linhagem germinativa têm maior probabilidade de que genes de anticorpo maduro conservem estruturas de sequência de aminoácidos essenciais características de indivíduos na espécie e, dessa forma, maior probabilidade de serem reconhecidos como de uma fonte estranha, quando usados terapeuticamente naquela espécie.

[210] Como usado nesse relatório descritivo, o termo "neutralizante" se refere à ação contrária à atividade biológica de um antígeno quando uma proteína de ligação se liga especificamente ao antígeno. Em uma modalidade, a proteína de ligação neutralizante se liga ao antígeno/alvo, por exemplo, citocina, quinase, fator do crescimento, proteína da superfície celular, proteína solúvel, fosfatase ou ligante de receptor, e reduz sua atividade biológica por pelo menos cerca de 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais.

[211] O termo "proteína de ligação", como usado nesse relatório descritivo, inclui qualquer polipeptídeo que se liga especificamente a um antígeno (por exemplo, TGF β 1) incluindo, sem limitação, um anticorpo, ou porções de ligação ao antígeno deste, um DVD-IgTM, um TVD-Ig, um RAb-Ig, um anticorpo biespecífico e um anticorpo específico duplo.

[212] O termo "anticorpo monoclonal" ou "mAb", quando

usado em um contexto de uma composição que compreende o mesmo, pode se referir a uma preparação de anticorpo obtida de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, ou seja, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, exceto por possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em pequenas quantidades. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único antígeno. Além disso, em contraste com preparações de anticorpo policlonal que tipicamente incluem anticorpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada mAb é dirigido contra um único determinante no antígeno. O modificador "monoclonal" não deve ser considerado como necessitando da produção do anticorpo por qualquer método particular.

[213] O termo "anticorpo humano recombinante", como usado nesse relatório descritivo, visa incluir todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, por exemplo, anticorpos expressos usando um vetor de expressão recombinante transfectado em uma célula hospedeira (descrita com mais detalhe na Seção II C, abaixo), anticorpos isolados de uma biblioteca combinatória de anticorpo humano, recombinante (Hoogenboom, H.R. (1997) *TIB Tech.* 15: 62-70; Azzazy, H. e Highsmith, W.E. (2002) *Clin. Biochem.* 35: 425-445; Gavilondo, J.V. e Larrick, J.W. (2002) *BioTechniques* 29: 128-145; Hoogenboom, H. e Chames, P. (2000) *Immunol. Today* 21: 371-378, incorporados nesse relatório descritivo por referência), anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico para genes de imunoglobulina humana (veja,

Taylor, L. D. e cols. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20: 6.287-6.295; Kellermann, S-A. e Green, L.L. (2002) *Cur. Opin. in Biotechnol.* 13: 593-597; Little, M. e cols. (2000) *Immunol. Today* 21: 364-370) ou anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por outros meios que envolvem *splicing* de sequências do gene de imunoglobulina humana com outras sequências de DNA. Esses anticorpos humanos recombinantes possuem regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Em certas modalidades, no entanto, esses anticorpos humanos recombinantes são submetidos à mutagênese *in vitro* (ou, quando um animal transgênico para sequências de Ig humana é usado, mutagênese somática *in vivo*) e, dessa forma, as sequências de aminoácidos das regiões VH e VL dos anticorpos recombinantes são sequências que, embora derivadas e relacionadas às sequências de VH e VL da linhagem germinativa humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório da linhagem germinativa do anticorpo humano *in vivo*.

[214] Como usado nesse relatório descritivo, o termo "Imunoglobulina de Domínio Variável Duplo" ou "DVD-IgTM" e semelhantes incluem proteínas de ligação que compreendem um polipeptídeo de DVD da cadeia pesada e um polipeptídeo de DVD da cadeia leve pareados, com cada cadeia pesada e leve pareada fornecendo dois sítios de ligação ao antígeno. Cada sítio de ligação inclui um total de 6 CDRs envolvidas na ligação ao antígeno por sítio de ligação ao antígeno. Um DVD-IgTM tipicamente possui dois braços ligados entre eles, pelo menos em parte, por dimerização dos domínios CH3, com cada braço do DVD sendo biespecífico, fornecendo uma imunoglobulina com quatro sítios de ligação. DVD-IgTM são

fornecidos nas Publicações de Patente U.S. N^{os} 2010/0260668 e 2009/0304693, cada uma delas incorporada nesse relatório descritivo por referência, incluindo listagens de sequências.

[215] Como usado nesse relatório descritivo, o termo "Imunoglobulina de Domínio Variável Triplo" ou "TVD-Ig" e semelhantes são proteínas de ligação que compreendem um polipeptídeo de proteína de ligação TVD da cadeia pesada e um polipeptídeo de proteína de ligação TVD da cadeia leve pareados com cada cadeia pesada e leve pareada fornecendo três sítios de ligação ao antígeno. Cada sítio de ligação inclui um total de 6 CDRs envolvidas na ligação ao antígeno por sítio de ligação ao antígeno. Uma proteína de ligação TVD pode ter dois braços ligados entre eles, pelo menos em parte, por dimerização dos domínios CH3, com cada braço da proteína de ligação TVD sendo triespecífico, fornecendo uma proteína de ligação com seis sítios de ligação.

[216] Como usado nesse relatório descritivo, o termo "Imunoglobulina de Receptor-Anticorpo" ou "RAb-Ig" e semelhantes são proteínas de ligação que compreendem um polipeptídeo RAb da cadeia pesada e um polipeptídeo RAb da cadeia leve, que juntos formam três sítios de ligação ao antígeno no total. Um sítio de ligação ao antígeno é formado por pareamento dos domínios variáveis pesados e leves de anticorpo presentes em cada um do polipeptídeo RAb da cadeia pesada e do polipeptídeo RAb da cadeia leve para formar um único sítio de ligação com um total de 6 CDRs, que fornecem um primeiro sítio de ligação ao antígeno. Cada um do polipeptídeo RAb da cadeia pesada e do polipeptídeo RAb da cadeia leve inclui uma sequência receptora que se liga

independentemente a um ligante fornecendo o segundo e terceiro sítios de ligação ao "antígeno". Um RAb-Ig tipicamente possui dois braços ligados entre eles, pelo menos em parte, por dimerização dos domínios CH3, com cada braço do RAb-Ig sendo trispecífico, fornecendo uma imunoglobulina com seis sítios de ligação. RAb-Igs são descritos na Publicação do Pedido de Patente U.S. Nº 2002/0127231, cujo conteúdo total, incluindo listagens de sequências, é incorporado nesse relatório descritivo por referência).

[217] O termo "anticorpo biespecífico", como usado nesse relatório descritivo, e como diferenciado de uma "proteína de ligação biespecífica *half-Ig*" ou "proteína de ligação biespecífica (*half-Ig*)", se refere aos anticorpos de comprimento total que são gerados pela tecnologia de quadroma (veja Milstein, C. e Cuello, A.C. (1983) *Nature* 305 (5934): páginas 537-540), por conjugação química de dois anticorpos monoclonais diferentes (veja Staerz, U.D. e cols. (1985) *Nature* 314 (6012): 628-631), ou por abordagens *knob-into-hole* ou similares, que introduzem mutações na região Fc que não inibem a dimerização CH3-CH3 (veja Holliger, P. e cols. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90 (14): 6.444-6.448), resultando em múltiplas espécies de imunoglobulina diferentes, das quais somente uma é o anticorpo biespecífico funcional. Por função molecular, um anticorpo biespecífico se liga a um antígeno (ou epítopo) em um de seus dois braços de ligação (um par de HC/LC), e se liga a um antígeno (ou epítopo) diferente em seu segundo braço (um par de HC/LC diferente). Por essa definição, um anticorpo biespecífico possui dois braços de ligação ao antígeno distintos (em termos de especificidade e sequências de CDR), e é

monovalente para cada antígeno ao qual se liga.

[218] O termo "anticorpo específico duplo", como usado nesse relatório descritivo, e como diferenciado de uma proteína de ligação biespecífica *half-Ig* ou uma proteína de ligação biespecífica, se refere aos anticorpos de comprimento total que podem se ligar a dois antígenos (ou epítomos) diferentes em cada um de seus dois braços de ligação (um par de HC/LC) (veja a Publicação PCT N° WO 02/02773). Consequentemente, uma proteína de ligação específica dupla possui dois braços de ligação ao antígeno idênticos, com especificidade idêntica e sequências de CDR idênticas, e é bivalente para cada antígeno ao qual se liga.

[219] O termo "Kon", como usado nesse relatório descritivo, visa a se referir à constante da taxa *on* para associação de uma proteína de ligação (por exemplo, um anticorpo) ao antígeno para formar, por exemplo, o complexo antígeno/anticorpo, como é conhecido na técnica. A "Kon" também é conhecida pelos os termos "constante da taxa de associação", ou "ka", como usado de forma intercambiável nesse relatório descritivo. Esse valor que indica a taxa de ligação de um anticorpo ao seu antígeno-alvo ou a taxa de formação de complexo entre um anticorpo e antígeno também é mostrado pela equação: Anticorpo ("Ab") + Antígeno ("Ag") → Ab-Ag.

[220] O termo "Koff", como usado nesse relatório descritivo, visa a se referir à constante da taxa *off* para dissociação de uma proteína de ligação (por exemplo, um anticorpo), por exemplo, do complexo antígeno/anticorpo, como é conhecido na técnica. A "Koff" também é conhecida pelos termos "constante da taxa de dissociação" ou "kd",

como usados de forma intercambiável nesse relatório descritivo. Esse valor indica a taxa de dissociação de um anticorpo de seu antígeno-alvo ou separação do complexo Ag-Ab ao longo do tempo em anticorpo e antígeno livres, como mostrado pela equação: $Ab + Ag \leftarrow Ab-Ag$.

[221] Os termos "constante de dissociação de equilíbrio" ou "KD", como usados de forma intercambiável nesse relatório descritivo, se referem ao valor obtido em uma medição de titulação no equilíbrio, ou por divisão da constante da taxa de dissociação (koff) pela constante da taxa de associação (kon). A constante da taxa de associação, a constante da taxa de dissociação e a constante de dissociação de equilíbrio são usadas para representar a afinidade de ligação de uma proteína de ligação, por exemplo, anticorpo, a um antígeno. Métodos para determinação das constantes da taxa de associação e de dissociação são bem conhecidos na técnica. O uso de técnicas baseadas em fluorescência oferece alta sensibilidade e a habilidade para examinar amostras em tampões fisiológicos no equilíbrio. Outras abordagens experimentais e instrumentos, por exemplo, um ensaio BIAcore® (análise de interação biomolecular), podem ser usados (por exemplo, instrumento disponível por BIAcore International AB, a GE Healthcare Company, Uppsala, Suécia). Adicionalmente, um ensaio KinExA® (Ensaio de Exclusão Cinética), disponível por Sapidyne Instruments (Boise, Idaho), também pode ser usado.

[222] Os termos "cristal" e "cristalizada", como usados nesse relatório descritivo, se referem a uma proteína de ligação (por exemplo, um anticorpo), ou porção de ligação ao antígeno desta, que existe na forma de um cristal. Cristais

são uma forma do estado sólido da matéria, que é distinta de outras formas como, por exemplo, o estado sólido amorfo ou o estado cristalino líquido. Cristais são compostos por arranjos tridimensionais regulares, repetitivos, de átomos, íons, moléculas (por exemplo, proteínas como, por exemplo, anticorpos), ou montagens moleculares (por exemplo, complexos antígeno/anticorpo). Esses arranjos tridimensionais estão dispostos de acordo com relacionamentos matemáticos específicos que são bem compreendidos no campo. A unidade fundamental, ou bloco modular, que é repetida em um cristal é denominada a unidade assimétrica. A repetição da unidade assimétrica em um arranjo que se adapta a certa simetria cristalográfica bem definida fornece a "célula unitária" do cristal. A repetição da célula unitária por translações regulares em todas as três dimensões fornece o cristal. Veja Giege, R. e Ducruix, A. Barrett, "Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach", 2ª Edição, páginas 201-16, Oxford University Press, Nova York, Nova York, (1999). O termo "vinculador" é usado para designar polipeptídeos que compreendem dois ou mais resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas e são usados para ligar uma ou mais porções de ligação ao antígeno. Esses polipeptídeos vinculadores são bem conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Holliger, P. e cols. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6.444-6.448; Poljak, R.J. e cols. (1994) *Structure* 2: 1.121-1.123). Vinculadores exemplares incluem, sem limitação, ASTKGPSVFPLAP (ID. DE SEQ. N°: 55), ASTKGP (ID. DE SEQ. N°: 56); TVAAPSVFIFPP (ID. DE SEQ. N°: 57); TVAAP (ID. DE SEQ. N°: 58); AKTTPKLEEGEFSEAR (ID. DE SEQ. N°: 59);

AKTTPKLEEGEFSEARV (ID. DE SEQ. N°: 60); AKTTPKLGG (ID. DE SEQ. N°: 61); SAKTTPKLGG (ID. DE SEQ. N°: 62); SAKTTP (ID. DE SEQ. N°: 63); RADAAP (ID. DE SEQ. N°: 64); RADAAPTVS (ID. DE SEQ. N°: 65); RADAAAAGGPGS (ID. DE SEQ. N°: 66); RADAAAA(G4S)4 (ID. DE SEQ. N°: 67); SAKTTPKLEEGEFSEARV (ID. DE SEQ. N°: 68); ADAAP (ID. DE SEQ. N°: 69); ADAAPTVSIFPP (ID. DE SEQ. N°: 70); QPKAAP (ID. DE SEQ. N°: 71); QPKAAPSVTLFPP (ID. DE SEQ. N°: 72); AKTTPP (ID. DE SEQ. N°: 73); AKTTPPSVTPLAP (ID. DE SEQ. N°: 74); AKTTAP (ID. DE SEQ. N°: 75); AKTTAPSVYPLAP (ID. DE SEQ. N°: 76); GGGGSGGGGSGGGGS (ID. DE SEQ. N°: 77); GENKVEYAPALMALS (ID. DE SEQ. N°: 78); GPAKELTPLKEAKVS (ID. DE SEQ. N°: 79); GHEAAVMQVQYPAS (ID. DE SEQ. N°: 80); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (ID. DE SEQ. N°: 81); e ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (ID. DE SEQ. N°: 82).

[223] Os termos "marcador" e "marcador detectável" ou "porção detectável" significam uma porção anexada a um parceiro de ligação específico, por exemplo, um anticorpo ou um analito, por exemplo, para tornar a reação entre membros de um par de ligação específico, por exemplo, um anticorpo e um analito, detectável, e o parceiro de ligação específico, por exemplo, anticorpo ou analito, assim marcado é chamado "marcado de forma detectável". Dessa forma, o termo "proteína de ligação marcada", como usado nesse relatório descritivo, se refere a uma proteína com um marcador incorporado que permite a identificação da proteína de ligação. Em uma modalidade, o marcador é um marcador detectável que pode produzir um sinal que é detectável por meios visuais ou instrumentais, por exemplo, incorporação de um aminoácido radiomarcado ou adesão a um polipeptídeo de porções de biotinil que podem ser detectadas por avidina marcada (por

exemplo, estreptavidina contendo um marcador fluorescente ou uma atividade enzimática que pode ser detectada por métodos ópticos ou colorimétricos). Exemplos de marcadores para polipeptídeos incluem, sem limitação, os seguintes: radioisótopos ou radionuclídeos (por exemplo, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho e ^{153}Sm); cromógenos; marcadores fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina e lantanídeo fósforos); marcadores enzimáticos (por exemplo, peroxidase de raiz-forte, luciferase e fosfatase alcalina); marcadores quimioluminescentes; grupos biotinil; epítomos de polipeptídeo predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, sequências de par de zíperes de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal e *tags* de epítopo); e agentes magnéticos, por exemplo, quelatos de gadolínio. Exemplos representativos de marcadores comumente empregados para imunoenaios incluem porções que produzem luz, por exemplo, compostos de acridínio, e porções que produzem fluorescência, por exemplo, fluoresceína. Outros marcadores são descritos nesse relatório descritivo. A esse respeito, a própria porção pode não ser marcada de forma detectável, mas pode se tornar detectável mediante reação com ainda outra porção. O uso do termo "marcado de forma detectável" visa englobar o último tipo de marcação detectável.

[224] Em algumas modalidades, a afinidade de ligação de um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, a um antígeno (por exemplo, complexo de proteína), por exemplo, um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1, é determinada com o uso de um ensaio Octet. Em algumas modalidades, um ensaio

Octet é um ensaio que determina um ou mais parâmetros cinéticos indicativos de ligação entre um anticorpo e antígeno. Em algumas modalidades, um sistema Octet® (ForteBio, Menlo Park, CA) é usado para determinar a afinidade de ligação de um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, a um complexo GARP-TGFβ1, um complexo LTBP1-TGFβ1, um complexo LTBP3-TGFβ1 e/ou um complexo LRRC33-TGFβ1. Por exemplo, afinidades de ligação de anticorpos podem ser determinadas usando o sistema de ensaio "forteBio Octet QK® Dip and Read Label Free" que utiliza interferometria de biocamadas. Em algumas modalidades, os antígenos são imobilizados a biossensores (por exemplo, biossensores revestidos com estreptavidina) e os anticorpos e complexos (por exemplo, complexos GARP-TGFβ1 biotinilados e complexos LTBP-TGFβ1 biotinilados) são apresentados em solução em concentração alta (50 µg/mL) para mediar interações de ligação. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação de um anticorpo, ou porção de ligação a um complexo GARP-TGFβ1, um complexo LTBP1-TGFβ1, um complexo LTBP3-TGFβ1 e/ou um complexo LRRC33-TGFβ1 é determinada usando o protocolo descrito na Tabela 6. O termo "ressonância de plasmônio de superfície", como usado nesse relatório descritivo, se refere a um fenômeno óptico que permite a análise de interações biespecíficas em tempo real por detecção de alterações em concentrações de proteína dentro de uma matriz biossensora, por exemplo, usando o sistema BIAcore® (BIAcore International AB, a GE Healthcare Company, Uppsala, Suécia e Piscataway, NJ). Para descrições adicionais, veja Jönsson, U. e cols. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26; Jönsson, U. e cols. (1991) *Biotechniques* 11: 620-

627; Johnsson, B. e cols. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125-131; e Johnsson, B. e cols. (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277.

Identificação e produção/fabricação de inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos

[225] A invenção engloba métodos de avaliação, métodos de produção e processos de fabricação de anticorpos ou fragmentos destes que se ligam a dois ou mais de: um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1, e composições farmacêuticas e kits relacionados que as compreendem.

[226] Vários métodos podem ser usados para obtenção de anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno destes, da revelação. Por exemplo, anticorpos podem ser produzidos usando métodos de DNA recombinante. Anticorpos monoclonais também podem ser produzidos por geração de hibridomas (veja, por exemplo, Kohler e Milstein (1975) *Nature*, 256: 495-499) de acordo com métodos conhecidos. Hibridomas formados dessa forma são então avaliados usando métodos-padrão, por exemplo, ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) e análise por ressonância de plasmônio de superfície (por exemplo, OCTET ou BIACORE), para identificar um ou mais hibridomas que produzem um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno especificado. Qualquer forma do antígeno especificado pode ser usada como o imunógeno, por exemplo, antígeno recombinante, formas de ocorrência natural, quaisquer variantes ou fragmentos deste, bem como peptídeo antigênico deste (por exemplo, qualquer um dos epítomos descritos nesse relatório descritivo como um epítomo linear ou dentro de um arcabouço como um epítomo

conformacional). Um método exemplar de produção de anticorpos inclui a avaliação das bibliotecas de expressão de proteínas que expressam anticorpos ou fragmentos destes (por exemplo, scFv), por exemplo, bibliotecas de exibição em fago ou ribossomo. A exibição em fago é descrita, por exemplo, em Ladner e cols., Patente U.S. N° 5.223.409; Smith (1985) *Science* 228: 1.315-1.317; Clackson e cols. (1991) *Nature*, 352: 624-628; Marks e cols. (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; e WO 90/02809.

[227] Além do uso de bibliotecas de exibição, o antígeno especificado (por exemplo, um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1) pode ser usado para imunizar um hospedeiro não humano, por exemplo, um roedor, por exemplo, um camundongo, hamster ou rato. Em uma modalidade, o animal não humano é um coelho, porquinho-da-índia, rato, camundongo, hamster, carneiro, cabra, galinha, camelídeo, bem como hospedeiros não mamíferos como, por exemplo, um tubarão. Em uma modalidade, o animal não humano é um camundongo.

[228] Em outra modalidade, um anticorpo monoclonal é obtido a partir do animal não humano, e depois modificado, por exemplo, quimérico, usando técnicas adequadas de DNA recombinante. Diversas abordagens para a produção de anticorpos quiméricos foram descritas. Veja, por exemplo, Morrison e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 6.851, 1985; Takeda e cols., *Nature* 314: 452, 1985, Cabilly e cols., Patente U.S. N° 4.816.567; Boss e cols., Patente U.S. N°

4.816.397; Tanaguchi e cols., Publicação de Patente Européia EP171496; Publicação de Patente Européia 0173494, Patente do Reino Unido GB 2177096B.

[229] Para técnicas adicionais de produção de anticorpo, veja "Antibodies: A Laboratory Manual", eds. Harlow e cols., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. A presente revelação não está necessariamente limitada a qualquer fonte, método de produção ou outras características especiais de um anticorpo.

[230] Alguns aspectos da presente revelação estão relacionados às células hospedeiras transformadas com um polinucleotídeo ou vetor. Células hospedeiras podem ser uma célula procariótica ou eucariótica. O polinucleotídeo ou vetor que está presente na célula hospedeira pode ser integrado no genoma da célula hospedeira ou pode ser mantido de forma extracromossômica. A célula hospedeira pode ser qualquer célula procariótica ou eucariótica, por exemplo, uma célula bacteriana, de inseto, fúngica, de planta, animal ou humana. Em algumas modalidades, células fúngicas são, por exemplo, aquelas do gênero *Saccharomyces*, em particular aquelas da espécie *S. cerevisiae*. O termo "procariótica" inclui todas as bactérias que possam ser transformadas ou transfectadas com um DNA ou moléculas de RNA para a expressão de um anticorpo ou das cadeias de imunoglobulina correspondentes. Hospedeiros procarióticos podem incluir bactérias gram-negativas, bem como gram-positivas como, por exemplo, por exemplo, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* e *Bacillus subtilis*. O termo "eucariótica" inclui células de leveduras, plantas superiores, insetos e vertebrados, por exemplo, de células de mamíferos, por

exemplo, células NSO e CHO. Dependendo do hospedeiro empregado em um procedimento de produção recombinante, os anticorpos ou cadeias de imunoglobulina codificados pelo polinucleotídeo podem ser glicosilados ou podem ser não glicosilados. Anticorpos ou as cadeias de imunoglobulina correspondentes também podem incluir um resíduo de aminoácido de metionina inicial.

[231] Em algumas modalidades, após um vetor ter sido incorporado em um hospedeiro apropriado, o hospedeiro pode ser mantido sob condições adequadas para expressão em nível elevado das sequências de nucleotídeos e, como desejado, a coleta e purificação das cadeias leves, cadeias pesadas, dímeros de cadeia leve/pesada de imunoglobulina ou anticorpos intactos, fragmentos de ligação ao antígeno ou outras formas de imunoglobulina podem ocorrer; veja, Beychok, "Cells of Immunoglobulin Synthesis", Academic Press, N.Y., (1979). Dessa forma, polinucleotídeos ou vetores são introduzidos nas células que, por sua vez, produzem o anticorpo ou fragmentos de ligação ao antígeno. Além disso, animais transgênicos, preferivelmente mamíferos, que compreendem as células hospedeiras mencionadas anteriormente podem ser usados para a produção em larga escala do anticorpo ou fragmentos de anticorpo.

[232] As células hospedeiras transformadas podem ser desenvolvidas em fermentadores e cultivadas com o uso de quaisquer técnicas adequadas para obter crescimento celular ótimo. Uma vez expressos, os anticorpos inteiros, seus dímeros, cadeias leves e pesadas individuais, outras formas de imunoglobulina, ou fragmentos de ligação ao antígeno, podem ser purificados de acordo com procedimentos

padronizados da técnica, incluindo precipitação com sulfato de amônio, colunas de afinidade, cromatografia em coluna, eletroforese em gel e semelhantes; veja, Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). O anticorpo ou fragmentos de ligação ao antígeno podem então ser isolados do meio de crescimento, lisados celulares ou frações da membrana celular. O isolamento e purificação, por exemplo, dos anticorpos expressos de forma microbiana, ou fragmentos de ligação ao antígeno, podem ser por qualquer meio convencional como, por exemplo, separações cromatográficas preparativas e separações imunológicas, tais como aquelas que envolvem o uso de anticorpos monoclonais ou policlonais dirigidos, por exemplo, contra a região constante do anticorpo.

[233] Aspectos da revelação estão relacionados a um hibridoma, que fornece uma fonte de anticorpos monoclonais indefinidamente prolongada. Como uma alternativa para a obtenção de imunoglobulinas diretamente a partir da cultura de hibridomas, células de hibridoma imortalizadas podem ser usadas como uma fonte de loci rearranjados de cadeia pesada e cadeia leve para expressão e/ou manipulação genética subsequente. Genes de anticorpo rearranjados podem ser transcritos de forma reversa a partir de mRNAs apropriados para produzir cDNA. Em algumas modalidades, a região constante da cadeia pesada pode ser trocada por aquela de um isótipo diferente ou totalmente eliminada. As regiões variáveis podem ser ligadas para codificar regiões Fv de cadeia única. Múltiplas regiões Fv podem ser ligadas para conferir habilidade de ligação a mais de um alvo ou combinações quiméricas de cadeia pesada e leve podem ser

empregadas. Qualquer método apropriado pode ser usado para clonagem de regiões variáveis de anticorpo e geração de anticorpos recombinantes.

[234] Em algumas modalidades, um ácido nucleico apropriado que codifica regiões variáveis de uma cadeia pesada e/ou leve é obtido e inserido em um vetor de expressão que pode ser transfectado em células hospedeiras recombinantes padronizadas. Várias dessas células hospedeiras podem ser usadas. Em algumas modalidades, células hospedeiras de mamíferos podem ser vantajosas para processamento e produção eficientes. Linhagens de células de mamíferos típicas úteis para essa finalidade incluem células CHO, células 293 ou células NSO. A produção do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode ser efetuada por cultivo de um hospedeiro recombinante modificado sob condições de cultura adequadas ao crescimento das células hospedeiras e à expressão das sequências codificadoras. Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno podem ser recuperados por seu isolamento da cultura. Os sistemas de expressão podem ser projetados para incluir peptídeos sinalizadores de modo que os anticorpos resultantes sejam secretados no meio; no entanto, a produção intracelular também é possível.

[235] A revelação também inclui um polinucleotídeo que codifica pelo menos uma região variável de uma cadeia de imunoglobulina dos anticorpos descritos nesse relatório descritivo. Em algumas modalidades, a região variável codificada pelo polinucleotídeo compreende pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR) da VH e/ou VL da região variável do anticorpo produzida por qualquer um

dos hibridomas descritos acima.

[236] Polinucleotídeos que codificam anticorpo ou fragmentos de ligação ao antígeno podem ser, por exemplo, DNA, cDNA, RNA ou DNA ou RNA produzido sinteticamente ou uma molécula de ácido nucleico quimérica produzida recombinantemente que compreende qualquer um daqueles polinucleotídeos isoladamente ou em combinação. Em algumas modalidades, um polinucleotídeo é parte de um vetor. Esses vetores podem compreender genes adicionais como, por exemplo, genes marcadores, que permitem a seleção do vetor em uma célula hospedeira adequada e sob condições adequadas.

[237] Em algumas modalidades, um polinucleotídeo é ligado operativamente às sequências de controle de expressão que permitem a expressão em células procarióticas ou eucarióticas. A expressão do polinucleotídeo compreende a transcrição do polinucleotídeo em um mRNA traduzível. Elementos regulatórios que asseguram a expressão em células eucarióticas, preferivelmente células de mamíferos, são bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Eles podem incluir sequências reguladoras que facilitam a iniciação da transcrição e, opcionalmente, sinais poli-A que facilitam a terminação da transcrição e estabilização do transcrito. Elementos reguladores adicionais podem incluir intensificadores da transcrição, bem como intensificadores da tradução, e/ou regiões promotoras naturalmente associadas ou heterólogas. Elementos reguladores possíveis que permitem a expressão em células hospedeiras procarióticas incluem, por exemplo, o promotor PL, Lac, Trp ou Tac em *E. coli*, e exemplos de elementos reguladores que permitem a expressão em células hospedeiras eucarióticas são o promotor AOX1 ou

GAL1 em leveduras ou o promotor de CMV, promotor de SV40, promotor de RSV (vírus do sarcoma de Rous), intensificador de CMV, intensificador de SV40 ou um íntron de globina em células de mamíferos e outras células animais.

[238] Além de elementos que são responsáveis pela iniciação da transcrição, esses elementos reguladores também podem incluir sinais de terminação da transcrição, por exemplo, o sítio SV40-poli-A ou o sítio tk-poli-A, a jusante do polinucleotídeo. Além disso, dependendo do sistema de expressão empregado, sequências-líderes capazes de dirigir o polipeptídeo para um compartimento celular ou sua secreção no meio podem ser adicionadas à sequência codificadora do polinucleotídeo e foram descritas previamente. A sequência-líder (ou sequências) é montada em fase apropriada com sequências de iniciação e terminação da tradução e, preferivelmente, uma sequência-líder capaz de dirigir a secreção da proteína traduzida, ou uma porção desta, por exemplo, no meio extracelular. Opcionalmente, pode ser usada uma sequência de polinucleotídeos heteróloga que codifica uma proteína de fusão que inclui um peptídeo de identificação do terminal-C ou -N que transmite características desejadas, por exemplo, estabilização ou purificação simplificada do produto recombinante expresso.

[239] Em algumas modalidades, polinucleotídeos que codificam pelo menos o domínio variável da cadeia leve e/ou pesada podem codificar os domínios variáveis de ambas as cadeias de imunoglobulina ou de apenas uma. Da mesma forma, polinucleotídeos podem estar sob o controle do mesmo promotor ou podem ser controlados separadamente para expressão. Além disso, alguns aspectos estão relacionados aos vetores,

particularmente plasmídeos, cosmídeos, vírus e bacteriófagos, usados convencionalmente em engenharia genética que compreendem um polinucleotídeo que codifica um domínio variável de uma cadeia de imunoglobulina de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno; opcionalmente em combinação com um polinucleotídeo que codifica o domínio variável da outra cadeia de imunoglobulina do anticorpo.

[240] Em algumas modalidades, sequências de controle de expressão são fornecidas como sistemas promotores eucarióticos em vetores capazes de transformar ou transfectar células hospedeiras eucarióticas, mas sequências de controle para hospedeiros procarióticos também podem ser usadas. Vetores de expressão derivados de vírus como, por exemplo, retrovírus, vírus da vaccínia, vírus adenoassociado, vírus do herpes ou vírus do papiloma bovino, podem ser usados para liberação dos polinucleotídeos ou vetor na população de células visada (por exemplo, para modificar geneticamente uma célula para expressar um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno). Diversos métodos apropriados podem ser usados para a construção de vetores virais recombinantes. Em algumas modalidades, polinucleotídeos e vetores podem ser reconstituídos em lipossomos para liberação às células-alvo. Os vetores contendo os polinucleotídeos (por exemplo, o domínio variável (ou domínios) pesado e/ou leve das sequências que codificam cadeias de imunoglobulina e sequências de controle de expressão) podem ser transferidos para a célula hospedeira por métodos adequados, que variam dependendo do tipo de hospedeiro celular.

[241] Os métodos de avaliação podem incluir uma etapa de

avaliação ou confirmação de atividades desejadas do anticorpo ou fragmento deste. Em algumas modalidades, a etapa compreende a seleção quanto à habilidade para inibir uma função-alvo, por exemplo, inibição da liberação de TGF β 1 maduro por um complexo latente. Em algumas modalidades, a etapa compreende a seleção de anticorpos ou fragmentos destes que promovem internalização e subsequente remoção de complexos anticorpo-antígeno da superfície da célula. Em algumas modalidades, a etapa compreende a seleção de anticorpos ou fragmentos destes que induzem ADCC. Em algumas modalidades, a etapa compreende a seleção de anticorpos ou fragmentos destes que se acumulam em um local (ou locais) desejado *in vivo* (por exemplo, tipo de célula, tecido ou órgão). Em algumas modalidades, a etapa compreende a seleção de anticorpos ou fragmentos destes com a habilidade para atravessar a barreira hematoencefálica. Os métodos podem opcionalmente incluir uma etapa de otimização de um ou mais anticorpos ou fragmentos destes para fornecer contrapartes variantes que possuem perfis desejáveis, como determinados por critérios como, por exemplo, estabilidade, afinidade de ligação, funcionalidade (por exemplo, atividades inibidoras, função de Fc etc.), imunogenicidade, sensibilidade ao pH e capacidade de desenvolvimento (por exemplo, solubilidade elevada, auto-associação baixa etc.). Essa etapa pode incluir a maturação de afinidade de um anticorpo ou fragmento deste. O anticorpo otimizado resultante é preferivelmente um anticorpo totalmente humano ou anticorpo humanizado adequado para administração humana. O processo de fabricação para uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo ou fragmento deste desse tipo pode compreender as etapas de

purificação, formulação, filtração estéril, empacotamento etc. Certas etapas como, por exemplo, filtração estéril, por exemplo, são realizadas de acordo com as diretrizes definidas órgãos reguladores relevantes como, por exemplo, o FDA (*supra*). Essas composições podem estar disponíveis em uma forma de recipientes de uso único, por exemplo, seringas pré-preenchidas, ou recipientes multidosagem, por exemplo, frascos.

Modificações

[242] Anticorpos da revelação, ou porções de ligação ao antígeno destes, podem ser modificados com um marcador detectável ou porção detectável incluindo, sem limitação, uma enzima, grupo prostético, material fluorescente, material luminescente, material bioluminescente, material radioativo, metal emissor de pósitron, íon metálico paramagnético não radioativo e marcador de afinidade para detecção e isolamento de um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1. A substância ou porção detectável pode ser acoplada ou conjugada diretamente aos polipeptídeos da revelação ou indiretamente, por meio de um intermediário (como, por exemplo, um vinculador (por exemplo, um vinculador clivável)) usando técnicas adequadas. Exemplos não limitantes de enzimas adequadas incluem peroxidase de raiz-forte, fosfatase alcalina, β -galactosidase, glicose oxidase, ou acetilcolinesterase; exemplos não limitantes de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos não limitantes de materiais fluorescentes adequados incluem biotina,

umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansila ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; exemplos não limitantes de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina e aquorina; e exemplos de material radioativo adequado incluem um íon de metal radioativo, por exemplo, emissores alfa ou outros radioisótopos, por exemplo, iodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), enxofre (^{35}S), trítio (^3H), índio ($^{115\text{m}}\text{In}$, $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{112}In , ^{111}In) e tecnécio (^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), tálio (^{201}Tl), gálio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paládio (^{103}Pd), molibdênio (^{99}Mo), xenônio (^{133}Xe), flúor (^{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 e estanho (^{113}Sn , ^{117}Sn). A substância detectável pode ser acoplada ou conjugada diretamente aos anticorpos da revelação que se ligam especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1, ou indiretamente, por meio de um intermediário (como, por exemplo, um vinculador) usando técnicas adequadas. Qualquer um dos anticorpos fornecidos nesse relatório descritivo que são conjugados a uma substância detectável pode ser usado para quaisquer ensaios diagnósticos adequados, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo.

[243] Além disso, anticorpos da revelação, ou porções de ligação ao antígeno destes, também podem ser modificados com um fármaco. O fármaco pode ser acoplado ou conjugado diretamente ao polipeptídeos da revelação, ou indiretamente, por meio de um intermediário (como, por exemplo, um

vinculador (por exemplo, um vinculador clivável)) usando técnicas adequadas.

Agentes de direcionamento

[244] Em algumas modalidades, os métodos da presente revelação compreendem o uso de um ou mais agentes de direcionamento para direcionar um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, como revelado nesse relatório descritivo, a um local particular em um indivíduo para fins de modulação da liberação de TGF β maduro por um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1. Por exemplo, complexos LTBP1-TGF β 1 e LTBP3-TGF β 1 são tipicamente localizados na matriz extracelular. Dessa forma, em algumas modalidades, os anticorpos revelados nesse relatório descritivo podem ser conjugados a agentes de direcionamento à matriz extracelular para fins de localização dos anticorpos nos locais onde os complexos LTBP1-TGF β 1 e LTBP3-TGF β 1 residem. Nessas modalidades, o direcionamento seletivo de anticorpos leva à modulação seletiva de complexos LTBP1-TGF β 1 e/ou LTBP3-TGF β 1. Em algumas modalidades, o direcionamento seletivo de anticorpos leva à inibição seletiva de complexos LTBP1-TGF β 1 e/ou LTBP3-TGF β 1 (por exemplo, para fins de tratamento de fibrose). Em algumas modalidades, os agentes de direcionamento à matriz extracelular incluem agentes de ligação à heparina, agentes de ligação à metaloproteínase da matriz, domínios de ligação de lisil oxidase, agentes de ligação à fibrilina, agentes de ligação ao ácido hialurônico, e outros.

[245] Similarmente, complexos GARP-TGF β 1 são tipicamente localizados na superfície das células, por exemplo, células

T regulatórias (Tregs) FOXP3⁺ ativadas. Dessa forma, em algumas modalidades, os anticorpos revelados nesse relatório descritivo podem ser conjugados a agentes de ligação à célula imune (por exemplo, célula Treg) para fins de localização dos anticorpos nos locais onde os complexos GARP-TGFβ1 residem. Nessas modalidades, o direcionamento seletivo de anticorpos leva à modulação seletiva de complexos GARP-TGFβ1. Em algumas modalidades, o direcionamento seletivo de anticorpos leva à inibição seletiva de complexos GARP-TGFβ1 (por exemplo, inibição seletiva da liberação de TGFβ1 maduro para fins de modulação imune, por exemplo, no tratamento de câncer). Nessas modalidades, agentes de direcionamento à célula Treg podem incluir, por exemplo, proteínas CCL22 e CXCL12 ou fragmentos destas.

[246] Em algumas modalidades, podem ser usados anticorpos biespecíficos que possuem uma primeira porção que se liga seletivamente a um complexo GARP-TGFβ1 e a um complexo LTBP-TGFβ1 e uma segunda porção que se liga seletivamente a um componente de um local-alvo, por exemplo, um componente da ECM (por exemplo, fibrilina) ou um componente de uma célula Treg (por exemplo, CTLA-4).

Composições farmacêuticas

[247] A invenção ainda fornece composições farmacêuticas usadas como um medicamento adequado à administração em indivíduos humanos e não humanos. Um ou mais anticorpos que se ligam especificamente a um complexo GARP-TGFβ1, um complexo LTBP1-TGFβ1, um complexo LTBP3-TGFβ1 e/ou um complexo LRRC33-TGFβ1 podem ser formulados ou misturados com um carreador farmacêuticamente aceitável (excipiente), incluindo, por exemplo, um tampão, para formar uma composição

farmacêutica. Essas formulações podem ser usadas para o tratamento de uma doença ou distúrbio que envolve a sinalização de TGF β . Em algumas modalidades, essa doença ou distúrbio associado à sinalização de TGF β envolve um ou mais contextos, ou seja, o TGF β está associado a um tipo ou tipos particulares de moléculas apresentadoras. Em algumas modalidades, esse contexto ocorre de uma forma tipo de célula-específica e/ou tecido-específica. Em algumas modalidades, por exemplo, essa ação contexto-dependente da sinalização de TGF β é mediada, em parte, por meio de GARP, LRRC33, LTBP1 e/ou LTBP3.

[248] Em algumas modalidades, o anticorpo da presente invenção se liga especificamente a dois ou mais contextos de TGF β , de modo que o anticorpo se liga ao TGF β em um complexo com moléculas apresentadoras selecionadas de duas ou mais de: GARP, LRRC33, LTBP1 e LTBP3. Dessa forma, essas composições farmacêuticas podem ser administradas aos pacientes para o alívio de uma indicação relacionada ao TGF β (por exemplo, fibrose, distúrbios imunes e/ou câncer). "Aceitável" significa que o carreador é compatível com o ingrediente ativo da composição (e, preferivelmente, capaz de estabilizar o ingrediente ativo) e não deletério ao indivíduo a ser tratado. Exemplos de excipientes farmacêuticamente aceitáveis (carreadores), incluindo tampões, seriam evidentes àqueles habilitados na técnica e foram descritos previamente. Veja, por exemplo, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª Edição (2000) Lippincott Williams e Wilkins, Ed. K. E. Hoover. Em um exemplo, uma composição farmacêutica descrita nesse relatório descritivo contém mais de um anticorpo que se liga

especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1, em que os anticorpos reconhecem epítomos/resíduos diferentes de um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1.

[249] As composições farmacêuticas a serem usadas nos presentes métodos podem compreender carreadores, excipientes ou estabilizantes farmacêuticamente aceitáveis na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas ("Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20^a Edição (2000) Lippincott Williams e Wilkins, Ed. K. E. Hoover). Carreadores, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são atóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações usadas, e podem compreender tampões como, por exemplo, fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (por exemplo, cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquil parabenos como, por exemplo, metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos do que cerca de 10 resíduos); proteínas, por exemplo, albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como, por exemplo, polivinilpirrolidona; aminoácidos como, por exemplo, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo glicose, manose ou dextranas; agentes quelantes como, por exemplo, EDTA; açúcares como,

por exemplo, sacarose, manitol, trehalose ou sorbitol; contra-íons formadores de sal como, por exemplo, sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos Zn-proteína); e/ou tensoativos não iônicos como, por exemplo, TWEENTM, PLURONICS TM ou polietileno glicol (PEG). Excipientes farmacologicamente aceitáveis são adicionalmente descritos nesse relatório descritivo.

[250] Em alguns exemplos, a composição farmacêutica descrita nesse relatório descritivo compreende lipossomos contendo um anticorpo que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1, que podem ser preparados por qualquer método adequado, por exemplo, como descrito em Epstein e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 3.688 (1985); Hwang e cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 4.030 (1980); e Patentes U.S. N^{os} 4.485.045 e 4.544.545. Lipossomos com tempo de circulação aumentado são revelados na Patente U.S. N^o 5.013.556. Lipossomos particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação de fase reversa com uma composição de lipídeos que compreende fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizada com PEG (PEG-PE). Lipossomos são extrusados por meio de filtros de tamanho de poro definido para gerar lipossomos com o diâmetro desejado.

[251] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas da invenção podem compreender ou podem ser usadas em conjunto com um adjuvante. É contemplado que certos adjuvantes podem reforçar as respostas imunes do indivíduo a, por exemplo, antígenos tumorais, e facilitar a função efetora de célula T, diferenciação de DC a partir de

monócitos, captação de antígeno e apresentação por APCs aumentadas etc. adjuvantes adequados incluem, sem limitação, adjuvantes baseados em ácido retinóico e derivados deste, adjuvantes baseados em emulsão óleo-em-água, por exemplo, MF59, e outros adjuvantes que contêm esqualeno, ligantes do receptor Toll-like (TRL), α -tocoferol (vitamina E) e derivados deste.

[252] Os anticorpos que se ligam especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 também podem ser capturados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas coloidais de liberação de fármacos (por exemplo, lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Técnicas exemplares foram descritas previamente; veja, por exemplo, "Remington, The Science and Practice of Pharmacy", 20ª Edição, Mack Publishing (2000).

[253] Em outros exemplos, a composição farmacêutica descrita nesse relatório descritivo pode ser formulada em formato de liberação sustentada. Exemplos adequados de preparações de liberação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros sólidos hidrofóbicos contendo o anticorpo, cujas matrizes estão na forma de artigos modelados, por exemplo, películas ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(álcool vinílico)), polilactídeos (Patente U.S. Nº

3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e 7-etil-L-glutamato, etileno-vinil acetato não degradável, copolímeros degradáveis de ácido lático-ácido glicólico como, por exemplo, o LUPRON DEPOT™ (microesferas injetáveis formadas por copolímero de ácido lático-ácido glicólico e acetato de leuprolida), acetato isobutirato de sacarose e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

[254] As composições farmacêuticas a serem usadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isso é facilmente obtido, por exemplo, por filtração através de membranas de filtração estéril. As composições de anticorpo terapêutico são geralmente colocadas em um recipiente que possui uma entrada de acesso estéril, por exemplo, uma bolsa ou frasco de solução intravenosa que possui uma tampa perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

[255] As composições farmacêuticas descritas nesse relatório descritivo podem estar em formas de dosagem unitária como, por exemplo, comprimidos, pílulas, cápsulas, pós, grânulos, soluções ou suspensões, ou supositórios, para administração oral, parenteral ou retal, ou administração por inalação ou insuflação.

[256] Para a preparação de composições sólidas como, por exemplo, comprimidos, o ingrediente ativo principal pode ser misturado com um carreador farmacêutico, por exemplo, ingredientes convencionais na produção de comprimidos como, por exemplo, amido de milho, lactose, sacarose, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio, fosfato dicálcico ou gomas, e outros diluentes farmacêuticos, por exemplo, água, para formar uma composição de pré-formulação sólida contendo uma mistura homogênea de um composto da

presente revelação, ou um sal farmacêuticamente aceitável atóxico deste. Quando se diz que essas composições de pré-formulação são homogêneas, significa que o ingrediente ativo está disperso igualmente por toda a composição, de modo que a composição possa ser facilmente subdividida em formas de dosagem unitária igualmente eficazes como, por exemplo, comprimidos, pílulas e cápsulas. Essa composição de pré-formulação sólida é então subdividida em formas de dosagem unitária do tipo descrito acima contendo de 0,1 mg até cerca de 500 mg do ingrediente ativo da presente revelação. Os comprimidos ou pílulas da nova composição podem ser revestidos ou de algum outro modo formados para fornecer uma forma de dosagem que gera a vantagem de ação prolongada. Por exemplo, o comprimido ou pílula pode compreender um componente de dosagem interno e um componente de dosagem externo, o último estando na forma de um envelope sobre o primeiro. Os dois componentes podem ser separados por uma camada entérica que serve para resistir à desintegração no estômago e permite que o componente interno passe intacto no duodeno ou que tenha a liberação retardada. Diversos materiais podem ser usados para essas camadas ou revestimentos entéricos, por exemplo, materiais que incluem vários ácidos poliméricos e misturas de ácidos poliméricos com materiais como, por exemplo, goma-laca, álcool cetílico e acetato de celulose.

[257] Agentes tensoativos adequados incluem, em particular, agentes não iônicos, por exemplo, polioxietilenossorbitanos (por exemplo, Tween™ 20, 40, 60, 80 ou 85) e outros sorbitanos (por exemplo, Span™ 20, 40, 60, 80 ou 85). Composições com um agente tensoativo

convenientemente compreenderão entre 0,05 e 5% de agente tensoativo, e pode estar entre 0,1 e 2,5%. Será observado que outros ingredientes podem ser adicionados, por exemplo, manitol ou outros veículos farmacêuticamente aceitáveis, se necessário.

[258] Emulsões adequadas podem ser preparadas com o uso de emulsões de gordura comercialmente disponíveis, por exemplo, Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ e Lipiphysan™. O ingrediente ativo pode estar dissolvido em uma composição de emulsão pré-misturada ou, alternativamente, pode estar dissolvido em um óleo (por exemplo, óleo de soja, óleo de açafrão, óleo de semente de algodão, óleo de gergelim, óleo de milho ou óleo de amêndoas) e uma emulsão formada por misturação com um fosfolípídeo (por exemplo, fosfolípídeos do ovo, fosfolípídeos da soja ou lecitina de soja) e água. Será observado que outros ingredientes podem ser adicionados, por exemplo, glicerol ou glicose, para ajustar a tonicidade da emulsão. Emulsões adequadas tipicamente conterão até 20% de óleo, por exemplo, entre 5 e 20%.

[259] As composições de emulsão podem ser aquelas preparadas por misturação de um anticorpo que se liga especificamente a um complexo GARP-TGFβ1, um complexo LTBP1-TGFβ1, um complexo LTBP3-TGFβ1 e/ou um complexo LRRC33-TGFβ1 com Intralipid™ ou os componentes destes (óleo de soja, fosfolípídeos do ovo, glicerol e água).

[260] Composições farmacêuticas para inalação ou insuflação incluem soluções e suspensões em solventes aquosos ou orgânicos farmacêuticamente aceitáveis, ou misturas deste, e pós. As composições líquidas ou sólidas

podem conter excipientes farmacologicamente aceitáveis adequados, como descrito acima. Em algumas modalidades, as composições são administradas pela via respiratória oral ou nasal para efeito local ou sistêmico.

[261] As composições em solventes farmacologicamente aceitáveis preferivelmente estéreis podem ser nebulizadas com o uso de gases. As soluções nebulizadas podem ser respiradas diretamente do dispositivo de nebulização ou o dispositivo de nebulização pode ser anexado a uma máscara facial, tenda ou respirador de pressão positiva intermitente. Composições em solução, suspensão ou pó podem ser administradas, preferivelmente oralmente ou nasalmente, por dispositivos que liberam a formulação de uma forma apropriada.

Seleção de indicações terapêuticas e/ou indivíduos com probabilidade de responder a uma terapia que compreende um agente seletivo que inibe amplamente TGFβ1

[262] Duas perguntas devem ser feitas quanto à identificação/seleção de indicações e/ou populações de pacientes adequadas para as quais os inibidores de TGFβ1 isoforma-específicos contexto-permissivos, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo, terão efeitos vantajosos: i) se a doença é dirigida ou é dependente predominantemente da isoforma TGFβ1 em relação a outras isoformas em humanos; e, ii) se a doença envolve a desregulação de múltiplos aspectos da função de TGFβ1.

[263] A expressão diferencial das três isoformas conhecidas de TGFβ, especificamente, TGFβ1, TGFβ2 e TGFβ3, foi observada sob condições normais (saudáveis; homeostáticas), bem como sob condições de doença em vários

tecidos. No entanto, o conceito de seletividade de isoforma não foi totalmente explorado nem obtido com abordagens convencionais que favorecem a pan-inibição de TGF β através de múltiplas isoformas. Além disso, os padrões de expressão das isoformas podem ser regulados diferencialmente, não apenas em condições normais (homeostáticas) vs. condições anormais (patológicas), mas também em diferentes subpopulações de pacientes. Como a maioria dos estudos pré-clínicos é realizada em um número limitado de modelos em animais, os dados obtidos com o uso desses modelos podem ser tendenciosos, resultando em interpretações errôneas de dados ou conclusões equivocadas quanto à aplicabilidade às condições humanas.

[264] Consequentemente, a presente invenção inclui o reconhecimento de que a expressão diferencial de isoformas de TGF β deve ser levada em conta na previsão da eficácia de inibidores particulares, bem como na interpretação de dados pré-clínicos quanto à capacidade de tradução em condições humanas. Como exemplificado na FIG. 21, TGF β 1 e TGF β 3 são co-dominantes em certos modelos de câncer singênicos murídeos (por exemplo, EMT-6 e 4T1) que são amplamente usados em estudos pré-clínicos. Em contraste, vários outros modelos de câncer (por exemplo, S91, B16 e MBT-2) expressam quase exclusivamente TGF β 1, similar ao que é observado em muitos tumores humanos, nos quais TGF β 1 parece ser mais frequentemente a isoforma dominante em relação a TGF β 2/3. Além disso, a isoforma(s) de TGF β predominantemente expressa sob condições homeostáticas pode não ser a isoforma(s) associada à doença. Por exemplo, em tecidos pulmonares normais em ratos saudáveis, a sinalização tônica de TGF β

parece ser mediada principalmente por TGF β 3. No entanto, TGF β 1 parece se tornar acentuadamente supra-regulado em condições de doença, por exemplo, fibrose pulmonar. Considerados em conjunto, é benéfico testar ou confirmar a expressão relativa de isoformas de TGF β em amostras clínicas de modo a selecionar terapêuticas adequadas às quais o paciente provavelmente responderá.

[265] Como descrito nesse relatório descritivo, os inibidores de TGF β 1 isoforma-seletivos são particularmente vantajosos para o tratamento de doenças nas quais a isoforma TGF β 1 é predominantemente expressa em relação às outras isoformas. Como um exemplo, a FIG. 21D fornece uma lista não limitante de amostras clínicas de câncer humano com níveis relativos de expressão de TGF β 1 (*esquerda*), TGF β 2 (*centro*) e TGF β 3 (*direita*). Cada linha horizontal através das três isoformas representa um único paciente. Como pode ser observado, a expressão global de TGF β 1 é significativamente maior na maioria desses tumores humanos do que as outras duas isoformas através de muitos tipos de tumor, sugerindo que a inibição TGF β 1-seletiva pode ser benéfica. Certas exceções devem ser observadas, no entanto. Primeiro, essa tendência nem sempre é aplicável em certos pacientes individuais. Ou seja, até mesmo em um tipo de câncer que mostra dominância de TGF β 1 quase uniformemente em relação a TGF β 2/3, há poucos indivíduos que não seguem essa regra geral. Pacientes incluídos na subpopulação minoritária, portanto, podem não responder a uma terapia com inibidor isoforma-específico na forma que funciona na maioria dos pacientes. Segundo, há poucos tipos de câncer nos quais TGF β 1 é co-dominante com outra isoforma ou nos quais a expressão

de TGF β 2 e/ou TGF β 3 é significativamente maior do que TGF β 1. Nessas situações, inibidores TGF β 1-seletivos tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo provavelmente não devem ser eficazes. Portanto, é benéfico testar ou confirmar os níveis relativos de expressão das três isoformas de TGF β (ou seja, TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3) em amostras clínicas coletadas de pacientes individuais. Essa informação pode fornecer uma melhor predição quanto à eficácia de uma terapia particular em pacientes individuais, o que pode ajudar a assegurar a seleção do tratamento apropriado (por exemplo, tratamento individualizado) a fim de aumentar a probabilidade de uma resposta clínica.

[266] Consequentemente, a invenção inclui um método para a seleção de uma população de pacientes ou um indivíduo que tem probabilidade de responder a uma terapia que compreende um inibidor de TGF β 1 contexto-permissivo isoforma-específico. Esse método compreende as etapas de: fornecimento de uma amostra biológica (por exemplo, amostra clínica) coletada de um indivíduo, determinação (por exemplo, medição ou testagem) dos níveis relativos de TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3 na amostra, e administração ao indivíduo de uma composição que compreende um inibidor de TGF β 1 contexto-permissivo isoforma-específico, se TGF β 1 é a isoforma dominante em relação a TGF β 2 e TGF β 3; e/ou, se TGF β 1 está significativamente superexpresso ou supra-regulado comparado com o controle. Os níveis relativos das isoformas podem ser determinados por ensaios baseados em RNA e/ou ensaios baseados em proteína, que são bem conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, a etapa de administração também pode incluir outra terapia, por exemplo, inibidores de *checkpoint*

imune, ou outros agentes fornecidos em qualquer outro local nesse relatório descritivo. Esses métodos podem opcionalmente incluir uma etapa de avaliação de uma resposta terapêutica por monitoramento de alterações nos níveis relativos de TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3 em dois ou mais pontos do tempo. Em algumas modalidades, são coletadas amostras clínicas (por exemplo, biópsias) tanto antes quanto depois da administração. Em algumas modalidades, são coletadas amostras clínicas (por exemplo, biópsias) várias vezes após o tratamento para avaliar os efeitos *in vivo* ao longo do tempo.

[267] Além da primeira pergunta em relação ao aspecto de seletividade da isoforma, a segunda pergunta questiona a amplitude da função de TGF β 1 envolvida em uma doença particular. Isso pode ser representado pelo número de contextos de TGF β 1, especificamente, qual molécula (ou moléculas) apresentadora medeia a função de TGF β 1 associada à doença. Inibidores de TGF β 1 específicos de contexto amplo, tais como inibidores contexto-permissivos e contexto-independentes, são vantajosos para o tratamento de doenças que envolvem tanto um componente da ECM quanto um componente imune da função de TGF β 1. Tal doença pode estar associada com desregulação na ECM, bem como perturbação na função da célula imune ou da resposta imune. Dessa forma, os inibidores de TGF β 1 descritos nesse relatório descritivo são capazes de visar TGF β 1 associado à ECM (por exemplo, apresentado por LTBP1 ou LTBP3), bem como TGF β 1 associado à célula imune (por exemplo, apresentado por GARP ou LRRC33). Em algumas modalidades, esses inibidores visam pelo menos três dos seguintes alvos terapêuticos (por exemplo, inibidores

"contexto-permissivos"): TGF β 1 pró/Latente associado a GARP; TGF β 1 pró/Latente associado a LRRC33; TGF β 1 pró/Latente associado a LTBP1; e, TGF β 1 pró/Latente associado a LTBP3. Em algumas modalidades, esses inibidores inibem todos os quatro alvos terapêuticos (por exemplo, inibidores "contexto-independentes"): TGF β 1 pró/Latente associado a GARP; TGF β 1 pró/Latente associado a LRRC33; TGF β 1 pró/Latente associado a LTBP1; e, TGF β 1 pró/Latente associado a LTBP3, de modo a inibir amplamente a função de TGF β 1 nesses contextos.

[268] Se uma condição particular de um paciente envolve ou não ou se é dirigida por múltiplos aspectos da função de TGF β 1 pode ser estimado por avaliação dos perfis de expressão das moléculas apresentadoras em uma amostra clínica coletada do paciente. Vários ensaios são conhecidos na técnica, incluindo ensaios baseados em RNA e ensaios baseados em proteína, que podem ser realizados para obter os perfis de expressão. Os níveis relativos de expressão (e/ou mudanças/alterações destes) de LTBP1, LTBP3, GARP e LRRC33 na amostra(s) podem indicar a fonte e/ou contexto de atividades de TGF β 1 associado com a condição. Por exemplo, uma amostra de biópsia retirada de um tumor sólido pode exibir expressão elevada de todas as quatro moléculas apresentadoras. Por exemplo, LTBP1 e LTBP3 podem ser altamente expressos em CAFs dentro do estroma tumoral, enquanto GARP e LRRC33 podem ser altamente expressos por células imunes associadas ao tumor, por exemplo, Tregs e infiltrado de leucócitos, respectivamente.

[269] Consequentemente, a invenção inclui um método para determinação (por exemplo, testagem ou confirmação) do

envolvimento de TGF β 1 na doença, em relação ao TGF β 2 e TGF β 3. Em algumas modalidades, o método ainda compreende uma etapa de: identificação de uma fonte (ou contexto) de TGF β 1 associada à doença. Em algumas modalidades, a fonte/contexto é avaliada por determinação da expressão de moléculas apresentadoras de TGF β , por exemplo, LTBP1, LTBP3, GARP e LRRC33 em uma amostra clínica retirada de pacientes.

[270] Inibidores de TGF β 1 isoforma-seletivos, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo, podem ser usados para tratar uma ampla variedade de doenças, distúrbios e/ou condições que estão associadas com desregulação de TGF β 1 (ou seja, indicações relacionadas ao TGF β 1) em indivíduos humanos. Como usado nesse relatório descritivo, o termo "doença (distúrbio ou condição) associada com desregulação de TGF β 1" ou "indicação relacionada ao TGF β 1" significa qualquer doença, distúrbio e/ou condição relacionada à expressão, atividade e/ou metabolismo de um TGF β 1 ou qualquer doença, distúrbio e/ou condição que pode se beneficiar da inibição da atividade e/ou níveis TGF β 1.

[271] Consequentemente, a presente invenção inclui o uso de um inibidor de TGF β 1 contexto-permissivo isoforma-específico em um método para o tratamento de uma doença associada à desregulação de TGF β 1 em um indivíduo humano. Esse inibidor é tipicamente formulado em uma composição farmacêutica que ainda compreende um excipiente farmacêuticamente aceitável. Vantajosamente, o inibidor visa tanto TGF β 1 associado à ECM quanto TGF β 1 associado à célula imune, mas não visa TGF β 2 ou TGF β 3 *in vivo*. Em algumas modalidades, o inibidor inibe a etapa de ativação de TGF β 1. A doença é caracterizada por desregulação ou deficiência em

pelo menos dois dos seguintes atributos: a) células T regulatórias (Treg); b) proliferação ou função de célula T efetora (Teff); c) proliferação ou diferenciação de células mielóides; d) recrutamento ou diferenciação de monócitos; e) função de macrófago; f) transição de epitelial-para-mesenquimal (EMT) e/ou transição de endotelial-para-mesenquimal (EndMT); g) expressão gênica em um ou mais de genes marcadores selecionados do grupo que consiste em: PAI-1, ACTA2, CCL2, Colla1, Col3a1, FN-1, CTGF e TGF β 1; h) componentes ou função da ECM; i) diferenciação de fibroblasto. Uma quantidade terapêuticamente eficaz desse inibidor é administrada ao indivíduo que sofre de ou diagnosticado com a doença.

[272] Em algumas modalidades, a doença envolve desregulação ou deficiência de componentes ou função da ECM compreende aquelas que exibem deposição aumentada de colágeno I.

[273] Em algumas modalidades, a desregulação ou deficiência de diferenciação de fibroblasto compreende miofibroblastos ou células miofibroblasto-*like* aumentadas. Em algumas modalidades, os miofibroblastos ou células miofibroblasto-*like* são fibroblastos associados ao câncer (CAFs). Em algumas modalidades, os CAFs estão associados com um estroma tumoral e podem produzir CCL2/MCP-1 e/ou CXCL12/SDF-1.

[274] Em algumas modalidades, a desregulação ou deficiência de células T regulatórias compreende atividade de Treg aumentada.

[275] Em algumas modalidades, a desregulação ou deficiência de proliferação ou função de célula T efetora

(Teff) compreende proliferação de células CD4+/CD8+ suprimida.

[276] Em algumas modalidades, a desregulação ou deficiência de proliferação ou diferenciação de células mielóides compreende proliferação aumentada de células progenitoras mielóides. A proliferação aumentada de células mielóides pode ocorrer em uma medula óssea.

[277] Em algumas modalidades, a desregulação ou deficiência de diferenciação de monócitos compreende diferenciação aumentada de monócitos derivados da medula óssea e/ou residentes no tecido em macrófagos em um local de doença, por exemplo, um tecido fibrótico e/ou um tumor sólido.

[278] Em algumas modalidades, a desregulação ou deficiência de recrutamento de monócitos compreende recrutamento aumentado de monócitos derivados da medula óssea em um local de doença como, por exemplo, TME, levando à diferenciação de macrófagos aumentada e polarização de M2, seguida por TAMs aumentados.

[279] Em algumas modalidades, a desregulação ou deficiência de função de macrófago compreende polarização aumentada dos macrófagos em fenótipos M2.

[280] Em algumas modalidades, a desregulação ou deficiência de proliferação ou diferenciação de células mielóides compreende um número aumentado de Tregs, MDSCs e/ou TANs.

[281] Indicações relacionadas ao TGF β podem incluir condições que compreendem um microambiente de doença excluído do sistema imune, por exemplo, tumor ou tecido canceroso que suprime o mecanismo de defesa/imunidade normal

do corpo, em parte por exclusão de células imunes efetoras (por exemplo, células T CD4+ e/ou CD8+). Em algumas modalidades, essas condições excluídas do sistema imune estão associadas com responsividade baixa a um tratamento. Sem se prender a uma teoria em particular, é contemplado que inibidores de TGF β , tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo, podem ajudar a se opor à habilidade do tumor para excluir a imunidade anticâncer por restauração do acesso de células T.

[282] Exemplos não limitantes de indicações relacionadas ao TGF β incluem: fibrose, incluindo fibrose de órgão (por exemplo, fibrose renal, fibrose hepática, fibrose cardíaca/cardiovascular e fibrose pulmonar), esclerodermia, síndrome de Alport, câncer (incluindo, sem limitação: cânceres sanguíneos como, por exemplo, leucemia, mielofibrose, mieloma múltiplo, câncer do cólon, câncer renal, câncer de mama, melanoma maligno, glioblastoma), fibrose associada com tumores sólidos (por exemplo, desmoplasia de câncer, por exemplo, melanoma desmoplásico, desmoplasia associada ao câncer pancreático e desmoplasia do carcinoma de mama), fibrose estromal (por exemplo, fibrose estromal da mama), fibrose induzida por radiação (por exemplo, síndrome de fibrose por radiação), facilitação da hematopoiese rápida após quimioterapia, cicatrização óssea, cicatrização de feridas, demência, mielofibrose, mielodisplasia (por exemplo, síndromes mielodisplásicas ou MDS), uma doença renal (por exemplo, doença renal em estágio final ou ESRD), obstrução ureteral unilateral (UUO), perda e/ou degeneração dentária, síndromes de proliferação endotelial, asma e alergia, distúrbios gastrintestinais,

anemia do envelhecimento, aneurisma aórtico, indicações órfãs (por exemplo, síndrome de Marfan e doença de Camurati-Engelmann), obesidade, diabetes, artrite, esclerose múltipla, distrofia muscular, esclerose lateral amiotrófica (ALS), doença de Parkinson, osteoporose, osteoartrite, osteopenia, síndromes metabólicas, distúrbios nutricionais, atrofia de órgãos, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e anorexia. Indicações adicionais podem incluir qualquer uma daquelas reveladas na Publicação U.S. N° 2013/0122007, Patente U.S. N° 8.415.459 ou Publicação Internacional N° WO 2011/151432, cujos conteúdos são incorporados neste relatório descritivo por referência em sua totalidade.

[283] Em modalidades preferidas, anticorpos, porções de ligação ao antígeno destes, e composições da revelação podem ser usados para tratar uma ampla variedade de doenças, distúrbios e/ou condições associadas com sinalização de TGF β 1. Em algumas modalidades, tecidos/células-alvo preferencialmente expressam a isoforma TGF β 1 em relação a outras isoformas. Dessa forma, a invenção inclui métodos para o tratamento dessa condição associada com expressão de TGF β 1 (por exemplo, desregulação da sinalização de TGF β 1 e/ou supra-regulação da expressão de TGF β 1) usando uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste descrito nesse relatório descritivo.

[284] Em algumas modalidades, a doença envolve TGF β 1 associado com (por exemplo, apresentado em ou depositado por) várias fontes celulares. Em algumas modalidades, essa doença envolve tanto um componente imune quanto um componente da ECM da função de TGF β 1. Em algumas modalidades, essa

doença envolve: i) desregulação da ECM (por exemplo, superprodução/deposição de componentes da ECM como, por exemplo, colágenos e proteases; rigidez alterada do substrato da ECM; ativação ou diferenciação anormal ou patológica de fibroblastos, por exemplo, miofibroblastos e CAFs); ii) supressão em consequência de Tregs aumentadas e/ou células T efetoras (Teff) suprimidas, por exemplo, proporções elevadas de Treg/Teff; infiltrado leucocitário aumentado (por exemplo, macrófagos e MDSCs) que causa supressão de células T CD4 e/ou CD8; e/ou iii) ativação, diferenciação, e/ou recrutamento anormal ou patológica de células mielóides, por exemplo, macrófagos (por exemplo, monócitos/macrófagos derivados da medula óssea e macrófagos residentes no tecido), monócitos, células supressoras de derivação mielóide (MDSCs), neutrófilos, células dendríticas e células NK.

[285] Em algumas modalidades, a condição envolve $\text{TGF}\beta 1$ apresentado por mais de um tipo de moléculas apresentadoras (por exemplo, dois ou mais de: GAPR, LRRC33, LTBP1 e/ou LTBP3). Em algumas modalidades, tecidos/órgãos/células afetados incluem $\text{TGF}\beta 1$ de várias fontes celulares. Em mais exemplo, um tumor sólido (que também pode incluir uma doença proliferativa que envolve a medula óssea, por exemplo, mielofibrose e mieloma múltiplo) pode incluir $\text{TGF}\beta 1$ de várias fontes, por exemplo, as células de câncer, células estromais, células saudáveis circundantes e/ou células imunes infiltrantes (por exemplo, leucócitos CD45+), que envolvem tipos diferentes de moléculas apresentadoras. Células imunes relevantes incluem, sem limitação, células mielóides e células linfóides, por exemplo, neutrófilos, eosinófilos,

basófilos, linfócitos (por exemplo, células B, células T e células NK), e monócitos. Inibidores de TGF β 1 contexto-independentes ou contexto-permissivos podem ser úteis para o tratamento dessas condições.

[286] Exemplos não limitantes de condições ou distúrbios que podem ser tratados com inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos contexto-permissivos, tais como anticorpos ou fragmentos destes descritos nesse relatório descritivo, são fornecidos abaixo.

Doenças com expressão gênica aberrante:

[287] Foi observado que a ativação anormal da via de transdução de sinal de TGF β 1 em várias condições de doença está associada com expressão gênica alterada de diversos marcadores. Esses marcadores da expressão gênica (por exemplo, como medidos por mRNA) incluem, sem limitação: Serpina 1 (que codifica PAI-1), MCP-1 (também conhecido como CCL2), Colla1, Col3a1, FN1, TGF β 1, CTGF e ACTA2 (que codifica α -SMA). Curiosamente, muitos desses genes estão implicados na participação em um conjunto diverso de condições de doença, incluindo vários tipos de fibrose de órgãos, bem como em muitos cânceres, que incluem mielofibrose. Na verdade, foi sugerida uma ligação fisiopatológica entre condições fibróticas e proliferação celular anormal, tumorigênese e metástases. Veja, por exemplo, Cox e Erler (2014) *Clinical Cancer Research* 20 (14): 3637-43 "Molecular Pathways: Connecting Fibrosis and Solid Tumor Metastasis"; Shiga e cols. (2015) *Cancers* 7: 2.443-2.458 "Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth"; Wynn e Barron (2010) *Semin. Liver Dis.* 30 (3): 245-257 "Macrophages: Master Regulators of

Inflammation and Fibrosis", cujos conteúdos são incorporados nesse relatório descritivo por referência. Sem se prender a uma teoria em particular, os inventores da presente revelação contemplam que a via de sinalização de TGF β 1 pode, na verdade, ser uma ligação crucial entre essas patologias amplas.

[288] Por exemplo, acredita-se que MCP-1/CCL2 participe tanto da fibrose quanto do câncer. MCP-1/CCL2 é caracterizada como uma quimiocina pró-fibrótica e é um quimioatraente de monócitos, e evidência sugerem que que possa estar envolvida na iniciação e progressão de câncer. Na fibrose, foi demonstrado que MCP-1/CCL2 tem um papel importante na fase inflamatória da fibrose. Por exemplo, a neutralização de MCP-1 resultou em uma diminuição dramática na formação de crescente glomerular e deposição de colágeno tipo I.

[289] A habilidade de MCP-1/CCL2 para recrutar monócitos/macrófagos tem consequências cruciais na progressão do câncer. MCP-1/CCL2 derivada de tumor pode promover fenótipos "pró-câncer" em macrófagos. Por exemplo, no câncer de pulmão, foi demonstrado que MCP-1/CCL2 é produzida por células estromais e promove metástase. No câncer pancreático humano, tumores secretam CCL2, e macrófagos imunossupressores CCR2-positivos infiltram esses tumores. Pacientes com tumores que exibem alta expressão de CCL2/baixo infiltrado de células T CD8 possuem sobrevida significativamente diminuída.

[290] Similarmente, o envolvimento de PAI-1/Serpina 1 foi implicado em diversos cânceres, angiogênese, inflamação, doenças neurodegenerativas (por exemplo, doença de Alzheimer). A expressão elevada de PAI-1 no tumor e/ou soro

está correlacionada com prognóstico ruim (por exemplo, sobrevida mais curta, metástase aumentada) em vários cânceres, por exemplo, câncer de mama e câncer da bexiga (por exemplo, carcinoma de célula transicional), bem como mielofibrose. No contexto de condições fibróticas, PAI-1 foi reconhecido como um efetor a jusante importante de fibrose induzida por TGF β 1, e a expressão de PAI-1 aumentada foi observada em várias formas de fibrose tecidual, incluindo fibrose pulmonar (por exemplo, IPF), fibrose renal, fibrose hepática e esclerodermia.

[291] Em algumas modalidades, os efeitos *in vivo* da terapia com inibidor de TGF β 1 podem ser avaliados por medição das alterações em marcadores gênicos. Marcadores adequados incluem TGF β (por exemplo, TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3). Em algumas modalidades, marcadores adequados incluem genes de transição mesenquimal (por exemplo, AXL, ROR2, WNT5A, LOXL2, TWIST2, TAGLN e/ou FAP), genes imunossupressores (por exemplo, IL10, VEGFA, VEGFC), genes quimiotáticos de monócito e macrófago (por exemplo, CCL2, CCL7, CCL8 e CCL13), e/ou vários marcadores fibróticos discutidos nesse relatório descritivo. Marcadores preferidos são marcadores plasmáticos.

[292] Como mostrado nos Exemplos desse relatório descritivo, os inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-independentes descritos nesse relatório descritivo podem reduzir os níveis de expressão de muitos desses marcadores em um modelo animal mecanístico, por exemplo, UUO, que demonstrou ser TGF β 1-dependente. Portanto, esses inibidores podem ser usados para tratar uma doença ou distúrbio caracterizado por expressão anormal (por exemplo, superexpressão/supra-regulação ou subexpressão/infra-

regulação) de um ou mais dos marcadores da expressão gênica.

[293] Dessa forma, em algumas modalidades, um inibidor de TGF β 1 isoforma-específico, contexto-permissivo ou contexto-independente é usado no tratamento de uma doença associada com superexpressão de um ou mais dos seguintes: PAI-1 (também conhecido como Serpina 1), MCP-1 (também conhecido como CCL2), Col1a1, Col3a1, FN1, TGF β 1, CTGF, α -SMA, ITGA11 e ACTA2, em que o tratamento compreende a administração do inibidor a um indivíduo que sofre da doença em uma quantidade eficaz para tratar a doença. Em algumas modalidades, o inibidor é usado para tratar uma doença associada com superexpressão de PAI-1, MCP-1/CCL2, CTGF e/ou α -SMA. Em algumas modalidades, a doença é mielofibrose. Em algumas modalidades, a doença é câncer, por exemplo, câncer que compreende um tumor sólido. Em algumas modalidades, a doença é fibrose de órgão, por exemplo, fibrose do fígado, do rim, do pulmão e/ou do tecido cardíaco ou cardiovascular.

Doenças que envolvem proteases:

[294] A ativação de TGF β de seu complexo latente pode ser desencadeada por integrina de um modo força-dependente, e/ou por proteases. Evidências sugerem que certas classes de proteases podem estar envolvidas no processo incluindo, sem limitação, Ser/Thr proteases como, por exemplo, Calicreínas, quimotripsina, elastases, plasmina, bem como metaloproteases de zinco da família MMP, por exemplo, MMP-2, MMP-9 e MMP-13. MMP-2 degrada o componente mais abundante da membrana basal, Colágeno IV, despertando a possibilidade de que pode participar da regulação da ECM associada ao TGF β 1. MMP-9 foi implicado em ter um papel central na progressão de tumor, angiogênese, remodelagem estromal e metástase. Dessa forma,

a ativação protease-dependente de TGF β 1 na ECM pode ser importante para o tratamento de câncer.

[295] Calicreínas (KLKs) são serina proteases tripsina- ou quimotripsina-*like* que incluem Calicreínas plasmáticas e Calicreínas teciduais. A ECM participa da homeostasia tecidual atuando como um arcabouço e barreira estrutural e de sinalização para suprimir o crescimento maligno excessivo. KLKs pode participar da degradação de proteínas da ECM e outros componentes que podem facilitar a expansão e invasão do tumor. Por exemplo, KLK1 está altamente supra-regulada em certos cânceres de mama e pode ativar pró-MMP-2 e pró-MMP-9. KLK2 ativa TGF β 1 latente, tornando o câncer de próstata adjacente a fibroblastos permissivos ao crescimento do câncer. KLK3 foi amplamente estudada como um marcador diagnóstico para o câncer de próstata (PSA). KLK3 pode ativar diretamente TGF β 1 por processamento de plasminogênio em plasmina, que cliva proteoliticamente LAP. KLK6 pode ser um marcador potencial para a doença de Alzheimer.

[296] Além disso, dados fornecidos no Exemplo 8 indicam que essas proteases podem ser uma Calicreína. Dessa forma, a invenção engloba o uso de um inibidor de TGF β isoforma-específico, contexto-independente ou permissivo em um método para o tratamento de uma doença associada com Calicreína ou uma protease Calicreína-*like*.

[297] Ativadores de TGF β 1 conhecidos, por exemplo, plasmina, TSP-1 e α V β 6 integrina, todas interagem diretamente com LAP. Postula-se que a clivagem proteolítica de LAP possa desestabilizar a interação LAP-TGF β liberando, dessa forma, TGF β 1 ativo. Foi sugerido que a região que contém 54-LSKLRL-59 é importante para a manutenção da

latência de TGF β 1. Dessa forma, agentes (por exemplo, anticorpos) que estabilizam a interação, ou bloqueiam a clivagem proteolítica de LAP, podem evitar a ativação de TGF β .

Doenças que envolvem a transição de epitelial-para-mesenquimal (EMT):

[298] EMT (transição epitelial-mesenquimal) é o processo pelo qual células epiteliais com junções aderentes mudam para propriedades (fenótipos) mesenquimais, por exemplo, contatos célula-célula frouxos. O processo é observado em vários processos biológicos normais, bem como em situações patológicas, incluindo embriogênese, cicatrização de feridas, metástases de câncer e fibrose (revisado, por exemplo, em Shiga e cols. (2015) "Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth". *Cancers*, 7: 2.443-2.458). Geralmente, acredita-se que sinais de EMT sejam induzidos principalmente por TGF β . Muitos tipos de câncer, por exemplo, parecem envolver a transdiferenciação de células em direção ao fenótipo mesenquimal (por exemplo, CAFs), o que se correlaciona com prognóstico mais pobre. Dessa forma, inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo, podem ser usados para tratar uma doença que é iniciada ou dirigida por EMT. Na verdade, dados exemplificados nesse relatório descritivo (por exemplo, FIGS. 12 e 13) mostram que esses inibidores possuem a habilidade para suprimir a expressão de marcadores de CAF *in vivo*, por exemplo, α -SMA, Coll (colágeno Tipo I), e FN (fibronectina).

Doenças que envolvem transição endotelial-para-mesenquimal

(EndMT) :

[299] Similarmente, TGF β também é um regulador crucial da transição endotelial-mesenquimal (EndMT) observada no desenvolvimento normal, por exemplo, na formação do coração. No entanto, o mesmo fenômeno ou fenômeno similar também é observado em muitas doenças, por exemplo, estroma de câncer. Em alguns processos de doença, marcadores endoteliais como, por exemplo, CD31, ficam infra-regulados mediante exposição ao TGF β 1 e, ao invés disso, a expressão de marcadores mesenquimais como, por exemplo, FSP-1, α -SMA e fibronectina, se torna induzida. Na verdade, CAFs estromais podem ser derivados de células endoteliais vasculares. Dessa forma, inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo, podem ser usados para tratar uma doença que é iniciada ou dirigida por EndMT.

Doenças que envolvem rigidez e remodelagem da matriz:

[300] A progressão de condições fibróticas envolve níveis aumentados de componentes da matriz depositados na ECM e/ou manutenção/remodelagem da ECM. TGF β 1, pelo menos em parte, contribui para esse processo. Isso é suportado, por exemplo, pela observação de que a deposição aumentada de componentes da ECM como, por exemplo, colágenos, pode alterar as propriedades físico-mecânicas da ECM (por exemplo, a rigidez da matriz/substrato) e esse fenômeno está associado à sinalização de TGF β 1. Para confirmar essa noção, os presentes inventores avaliaram o papel de rigidez da matriz para afetar a ativação de TGF β integrina-dependente em fibroblastos primários transfectados com pró-TGF β e LTBP1, e desenvolvidos em substratos baseados em silício com rigidez

definida (por exemplo, 5 kPa, 15 kPa ou 100 kPa). Como resumido na seção de Exemplos abaixo, matrizes com rigidez maior aumentam a ativação de TGF β 1, e isso pode ser suprimido por inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo. Essas observações sugerem que TGF β 1 influencia as propriedades da ECM (por exemplo, rigidez) o que, por sua vez, pode induzir ainda mais a ativação de TGF β 1, o que reflete a progressão de doença. Dessa forma, inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo podem ser usados para bloquear esse processo para se opor à progressão de doença que envolve alterações da ECM, por exemplo, fibrose, crescimento tumoral, invasão, metástase e desmoplasia. O braço de LTBP desses inibidores pode bloquear diretamente complexos de TGF β pró/Latente associados à ECM que são apresentados por LTBP1 e/ou LTBP3 evitando, dessa forma, ativação/Liberação do fator de crescimento pelo complexo no nicho da doença. Em algumas modalidades, os inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo podem normalizar a rigidez da ECM para tratar uma doença que envolve sinalização integrina-dependente. Em algumas modalidades, a integrina compreende uma cadeia α 11, cadeia β 1, ou ambas.

Fibrose:

[301] De acordo com a invenção, inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo, são usados no tratamento de fibrose (por exemplo, indicações fibróticas,

condições fibróticas) em um indivíduo. Inibidores adequados para realização da presente invenção incluem anticorpos e/ou composições de acordo com a presente revelação que podem ser úteis para alteração ou melhora de fibrose. Mais especificamente, esses anticorpos e/ou composições são antagonistas seletivos de TGF β 1 que são capazes de visar TGF β 1 apresentado por vários tipos de moléculas apresentadoras. TGF β 1 é reconhecido como o orquestrador central da resposta fibrótica. Anticorpos que visam TGF β 1 diminuem a fibrose em diversos modelos pré-clínicos. Esses anticorpos e/ou compostos baseados em anticorpo incluem LY2382770 (Eli Lilly, Indianapolis, IN). Também são incluídos aqueles descritos nas Patentes U.S. Números US 6.492.497, US 7.151.169, US 7.723.486 e Publicação de Pedido U.S. N° 2011/0008364, cujo conteúdo de cada um deles é incorporado nesse relatório descritivo por referência em sua totalidade. Antagonistas de TGF β da técnica estabelecida incluem, por exemplo, agentes que visam e bloqueiam a ativação de TGF β integrina-dependente.

[302] No entanto, evidências sugerem que esses agentes da técnica estabelecida técnica podem não mediar a inibição isoforma-específica e podem causar efeitos indesejados por bloquearem inadvertidamente a função normal de TGF β 2 e/ou TGF β 3. Na verdade, dados apresentados nesse relatório descritivo dão suporte a essa noção. Tecidos pulmonares normais (não doentes) contêm níveis relativamente baixos, mas mensuráveis, de TGF β 2 e TGF β 3, mas notavelmente menos TGF β 1. Em comparação, em certas condições de doença como, por exemplo, fibrose, TGF β 1 se torna preferencialmente supra-regulado em relação às outras isoformas. De

preferência, antagonistas de TGF β para uso no tratamento dessas condições exercem suas atividades inibidoras somente contra a isoforma induzida na doença ou associada à doença preservando, ao mesmo tempo, a função das outras isoformas que são normalmente expressas para mediar a sinalização tônica no tecido. Vantajosamente, como demonstrado no Exemplo 20 abaixo, um inibidor de TGF β 1 contexto-permissivo isoforma-específico englobado pela presente revelação mostra pouco efeito na lavagem broncoalveolar (BAL) de ratos saudáveis, dando suporte à noção de que a sinalização tônica de TGF β (por exemplo, TGF β 2 e/ou TGF β 3) não é perturbada. Em contraste, foi demonstrado que os inibidores da técnica estabelecida (LY2109761, um antagonista do receptor de TGF β de pequena molécula, e um anticorpo monoclonal que visa integrina α V β 6) inibem a sinalização tônica de TGF β a jusante em BAL de rato não doente, despertando a possibilidade de que esses inibidores possam causar efeitos colaterais indesejados. Alternativamente ou adicionalmente, agentes que visam e bloqueiam a ativação de TGF β integrina-dependente podem ser capazes de bloquear somente um subconjunto de integrinas responsável pela ativação de TGF β 1 associada à doença, entre vários tipos de integrina que são expressos por vários tipos de células e participam na patogênese. Além disso, até mesmo quando esses antagonistas podem bloquear seletivamente a ativação mediada por integrina da isoforma TGF β 1, eles podem ser ineficazes no bloqueio da ativação de TGF β 1 desencadeada por outros modos, por exemplo, ativação protease-dependente. Em contraste, os inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo visam evitar a

etapa de ativação de TGF β 1 independentemente do modo de ativação particular mantendo, ao mesmo tempo, a seletividade de isoforma.

[303] Indicações fibróticas para as quais os anticorpos e/ou composições da presente revelação podem ser usados terapeuticamente incluem, sem limitação, indicações pulmonares (por exemplo, fibrose pulmonar idiopática (IPF), distúrbio pulmonar obstrutivo crônico (DPOC), asma alérgica, lesão pulmonar aguda, esofagite eosinofílica, hipertensão arterial pulmonar e lesão por gás químico), indicações renais (por exemplo, glomeruloesclerose diabética, glomeruloesclerose segmentar focal (FSGS), doença renal crônica (CKD), fibrose associada com transplante renal e rejeição crônica, nefropatia por IgA, e síndrome urêmica hemolítica), fibrose hepática (por exemplo, esteatohepatite não alcoólica (NASH), hepatite viral crônica, parasitemia, erros inatos de metabolismo, fibrose mediada por toxinas, por exemplo, fibrose alcoólica, esteatohepatite não alcoólica-carcinoma hepatocelular (NASH-HCC), cirrose biliar primária e colangite esclerosante), fibrose cardiovascular (por exemplo, cardiomiopatia, cardiomiopatia hipertrófica, aterosclerose e reestenose), esclerose sistêmica, fibrose cutânea (por exemplo, fibrose cutânea na esclerose sistêmica, esclerose sistêmica cutânea difusa, esclerodermia, cicatrização cutânea patológica, quelóide, cicatrização pós-cirúrgica, cirurgia de revisão de cicatriz, cicatrização induzida por radiação e feridas crônicas) e cânceres ou fibrose secundária (por exemplo, mielofibrose, câncer da cabeça e pescoço, leucemia megacarioblástica aguda M7 e mucosite). Outras doenças, distúrbios ou condições

relacionadas à fibrose (incluindo distúrbios degenerativos) que podem ser tratadas usando compostos e/ou composições da presente revelação incluem, sem limitação, adenomiose, endometriose, síndrome de Marfan, síndrome da pele rígida, esclerodermia, artrite reumatóide, fibrose da medula óssea, doença de Crohn, colite ulcerativa, lúpus eritematoso sistêmico, distrofia muscular (por exemplo, DMD), doença de Parkinson, ALS, contratura de Dupuytren, doença de Camurati-Engelmann, cicatrização neural, demência, vitreorretinopatia proliferativa, lesão corneana, complicações após a cirurgia de drenagem de glaucoma e esclerose múltipla. Muitas dessas indicações fibróticas também estão associadas com inflamação do tecido(s) afetado, indicando envolvimento de um componente imune.

[304] Em algumas modalidades, as indicações fibróticas que podem ser tratadas com as composições e/ou métodos descritos nesse relatório descritivo incluem fibrose de órgão, por exemplo, fibrose do pulmão (por exemplo, IPF), fibrose do rim (por exemplo, fibrose associada com CKD), fibrose do fígado, fibrose do coração ou tecidos cardíacos, fibrose da pele (por exemplo, esclerodermia), fibrose do útero (por exemplo, endométrio, miométrio) e fibrose da medula óssea. Em algumas modalidades, essa terapia pode reduzir ou retardar a necessidade de transplante de órgão em pacientes. Em algumas modalidades, essa terapia pode prolongar a sobrevida dos pacientes.

[305] Para tratar IPF, pacientes que podem se beneficiar do tratamento incluem aqueles com IPF familiar e aqueles com IPF esporádica. A administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um inibidor de TGF β 1 isoforma-

específico, contexto-permissivo pode reduzir o acúmulo de miofibroblastos nos tecidos pulmonares, reduzir os depósitos de colágeno, reduzir os sintomas de IPF, melhorar ou manter a função pulmonar, e prolongar a sobrevida. Em algumas modalidades, o inibidor bloqueia a ativação de TGF β 1 associado à ECM (por exemplo, TGF β 1 pró/Latente apresentado por LTBP1/3) dentro do ambiente fibrótico da IPF. O inibidor pode opcionalmente ainda bloquear a ativação de TGF β 1 associado a macrófagos (por exemplo, TGF β 1 pró/Latente apresentado por LRRC33), por exemplo, macrófagos alveolares. Como resultado, o inibidor pode suprimir a liberação de fibronectina e outros fatores associados à fibrose.

[306] Os inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, tais como aqueles fornecidos neste relatório descritivo, podem ser usados para tratar condições fibróticas do fígado, por exemplo, fígado gorduroso (por exemplo, NASH). O fígado gorduroso pode ou não estar inflamado. A inflamação do fígado em consequência do fígado gorduroso (ou seja, esteatohepatite) pode se desenvolver em cicatrização (fibrose), que então frequentemente progride para cirrose (cicatrização que distorce a estrutura do fígado e prejudica sua função). O inibidor pode, portanto, ser usado para tratar essas condições. Em algumas modalidades, o inibidor bloqueia a ativação de TGF β 1 associado à ECM (por exemplo, TGF β 1 pró/Latente apresentado por LTBP1/3) dentro do ambiente fibrótico do fígado. O inibidor pode opcionalmente ainda bloquear a ativação de TGF β 1 associado a macrófagos (por exemplo, TGF β 1 pró/Latente apresentado por LRRC33), por exemplo, células de Kupffer (também conhecidas como macrófagos estrelados), bem como macrófagos derivados

de monócitos e MDSCs infiltrantes. Como resultado, o inibidor pode suprimir fatores associados à fibrose. A administração do inibidor em um indivíduo com essas condições pode reduzir um ou mais sintomas, evitar ou retardar a progressão da doença, reduzir ou estabilizar os acúmulos de gordura no fígado, reduzir biomarcadores associados à doença (por exemplo, fragmentos colágeno do soro), reduzir a cicatrização do fígado, reduzir a rigidez do fígado, e/ou de algum outro modo produzir resultado final clinicamente significativo em uma população de pacientes tratados com o inibidor, quando comparado com uma população de controle não tratada com o inibidor. Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz do inibidor pode obter tanto gordura hepática reduzida quanto fibrose hepática reduzida (por exemplo, cicatrização) em pacientes com NASH. Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz do inibidor pode obter melhora da fibrose por pelo menos um estágio sem piora da esteatohepatite em pacientes com NASH. Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz do inibidor pode reduzir a taxa de ocorrência de insuficiência hepática e/ou câncer do fígado em pacientes com NASH. Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz do inibidor pode normalizar, comparado com o controle, os níveis de vários biomarcadores séricos inflamatórios ou fibróticos, como avaliados após o início da terapia, em, por exemplo, 12-36 semanas. Em algumas modalidades, em pacientes com NASH, os inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos podem ser administrados em pacientes que recebem uma ou mais terapias adicionais incluindo, sem limitação, inibidores de miostatina, que podem geralmente a regulação metabólica em

pacientes com manifestação clínica de síndrome metabólica, incluindo NASH.

[307] Os inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, tais como aqueles fornecidos neste relatório descritivo, podem ser usados para tratar condições fibróticas do rim, por exemplo, doenças caracterizadas por acúmulo de matriz extracelular (nefropatia por IgA, glomeruloesclerose focal e segmentar, glomerulonefrite crescêntica, nefrite lúpica e nefropatia diabética) nas quais a expressão significativamente aumentada de TGF β nos glomérulos e no interstício tubular foi observada. Embora a deposição glomerular e no interstício tubular de dois componentes da matriz induzida por TGF β , fibronectina EDA+ e PAI-1, estivesse significativamente elevada em todas as doenças com acúmulo de matriz, a análise de correlação revelou um relacionamento íntimo primariamente com a isoforma TGF β 1. Consequentemente, os inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos são úteis como terapêutica para um espectro de distúrbios glomerulares humanos, nos quais TGF β está associado com acúmulo patológico de matriz extracelular.

[308] Em algumas modalidades, a condição fibrótica do rim está associada à doença renal crônica (CKD). CKD é causada primariamente por hipertensão arterial ou diabetes e causa mais de um milhão de mortes a cada ano. Os pacientes com CKD necessitam de cuidados médicos por toda a vida, que variam de dietas rigorosas e medicações até diálise e transplantes. Em algumas modalidades, a terapia com inibidor de TGF β 1 descrita nesse relatório descritivo pode reduzir ou retardar a necessidade de diálise e/ou transplante. Em algumas

modalidades, essa terapia pode reduzir a necessidade (por exemplo, dosagem, frequência) de outros tratamentos. Em algumas modalidades, os inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, podem ser administrados em pacientes que recebem uma ou mais terapias adicionais incluindo, sem limitação, inibidores de miostatina, que podem geralmente aumentar a regulação metabólica em pacientes com CKD.

[309] A fibrose de órgão que pode ser tratada com os métodos fornecidos neste relatório descritivo inclui fibrose cardíaca (por exemplo, cardiovascular). Em algumas modalidades, a fibrose cardíaca está associada à insuficiência cardíaca, por exemplo, insuficiência cardíaca crônica (CHF). Em algumas modalidades, a insuficiência cardíaca pode estar associada a doenças miocárdicas e/ou doenças metabólicas. Em algumas modalidades, os inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, podem ser administrados em pacientes que recebem uma ou mais terapias adicionais incluindo, sem limitação, inibidores de miostatina em pacientes com disfunção cardíaca que envolve fibrose cardíaca e distúrbio metabólico.

[310] Em algumas modalidades, condições fibróticas que podem ser tratadas com as composições e/ou métodos descritos nesse relatório descritivo incluem desmoplasia. Desmoplasia pode ocorrer em torno de uma neoplasia, causando fibrose densa em torno do tumor (por exemplo, estroma desmoplásico), ou tecido cicatricial dentro do abdome após cirurgia abdominal. Em algumas modalidades, a desmoplasia está associada com tumor maligno. Em função de sua formação densa que circunda a malignidade, terapêuticas anticâncer

convencionais (por exemplo, quimioterapia) não penetram eficazmente até alcançar as células cancerosas para obter efeitos clínicos. Inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo podem ser usados para romper a desmoplasia, de modo que a formação fibrótica possa ser despreendida para ajudar os efeitos da terapia anticâncer. Em algumas modalidades, os inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos podem ser usados como monoterapia (mais abaixo).

[311] Para tratar pacientes com condições fibróticas, inibidores TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, são administrados a um indivíduo em uma quantidade eficaz para tratar a fibrose. A quantidade eficaz desse anticorpo é uma quantidade eficaz para obter tanto eficácia terapêutica, quanto segurança clínica no indivíduo. Em algumas modalidades, o inibidor é um anticorpo contexto-permissivo que pode bloquear a ativação de um TGF β 1 mediado por LTBP localizado (por exemplo, aderido) na ECM e TGF β 1 mediado por GARP localizado (por exemplo, aderido) em células imunes. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo contexto-permissivo que pode bloquear a ativação de um TGF β 1 mediado por LTBP localizado na ECM e TGF β 1 mediado por LRRC33 localizado (por exemplo, aderido) em monócitos/macrófagos. Em algumas modalidades, a LTBP é LTBP1 e/ou LTBP3. Em algumas modalidades, o direcionamento e inibição de TGF β 1 apresentado por LRRC33 em macrófagos pró-fibróticos, M2-like, no microambiente fibrótico podem ser benéficos.

[312] Ensaios úteis na determinação da eficácia dos anticorpos e/ou composições da presente revelação para a

alteração de fibrose incluem, sem limitação, ensaios histológicos para a contagem de fibroblastos e análises imunohistoquímicas básicas conhecidas na técnica.

Mielofibrose:

[313] Mielofibrose, também conhecida como osteomielofibrose, é um distúrbio proliferativo da medula óssea relativamente raro (câncer), que pertence a um grupo de doenças denominadas distúrbios mieloproliferativos. A mielofibrose é classificada no ramo de Cromossomo Filadélfia negativo (-) de neoplasias mieloproliferativas. Mielofibrose é caracterizada por mieloproliferação clonal, produção aberrante de citocinas, hematopoiese extramedular e fibrose da medula óssea. A proliferação de um clone anormal de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea e em outros locais e resulta em fibrose, ou na substituição da medula com tecido cicatricial. O termo "mielofibrose", salvo especificação em contrário, se refere à mielofibrose primária (PMF). Isso também pode ser referido como mielofibrose idiopática crônica (CIMF) (os termos "idiopática" e "primária" significam que, nesses casos, a doença é de origem desconhecida ou espontânea). Isso está em contraste com mielofibrose, que se desenvolve secundariamente à policitemia vera ou trombocitopenia essencial. A mielofibrose é uma forma de metaplasia mielóide, que se refere a uma alteração no tipo de célula no tecido que forma o sangue da medula óssea, e frequentemente os dois termos são usados de forma sinônima. Os termos metaplasia mielóide agnogênica e mielofibrose com metaplasia mielóide (MMM) também são usados para se referir à mielofibrose primária. Em algumas modalidades, os distúrbios

proliferativos hematológicos que podem ser tratados de acordo com a presente invenção incluem distúrbios mieloproliferativos, por exemplo, mielofibrose. O denominado grupo "clássico" de distúrbios mieloproliferativos crônicos BCR-ABL (Ph)-negativos inclui trombocitemia essencial (ET), policitemia vera (PV) e mielofibrose primária (PMF).

[314] A mielofibrose rompe a produção normal de células sanguíneas do corpo. O resultado é cicatrização extensa na medula óssea, levando à anemia severa, fraqueza, fadiga e frequentemente a um baço aumentado. A produção de citocinas como, por exemplo, fator de crescimento de fibroblastos, pelo clone anormal de células hematopoiéticas (particularmente por megacariócitos) leva à substituição do tecido hematopoiético da medula óssea por tecido conjuntivo por meio de fibrose por colágeno. A diminuição no tecido hematopoiético prejudica a habilidade do paciente para gerar novas células sanguíneas, resultando em pancitopenia progressiva, uma diminuição de todos os tipos de células sanguíneas. No entanto, acredita-se que a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno sejam um fenômeno secundário, e os fibroblastos propriamente ditos podem não ser parte do clone de células anormal.

[315] A mielofibrose pode ser causada por células-tronco sanguíneas anormais na medula óssea. As células-tronco anormais produzem células maduras e pouco diferenciadas que crescem rapidamente e assumem a medula óssea, causando tanto fibrose (formação de tecido cicatricial) quanto inflamação crônica.

[316] A mielofibrose primária está associada com mutações em Janus quinase 2 (JAK2), receptor de trombopoietina (MPL)

e calreticulina (CALR), o que pode levar à ativação constitutiva da via de JAK-STAT, e ocorre cicatrização progressiva, ou fibrose, da medula óssea. Os pacientes podem desenvolver hematopoiese extramedular, ou seja, formação de células sanguíneas que ocorre em locais diferentes da medula óssea, na medida em que as células hematopoiéticas são forçadas a migrar para outras áreas, particularmente para o fígado e baço. Isso causa um aumento desses órgãos. No fígado, o tamanho anormal é denominado hepatomegalia. O aumento do baço é denominado esplenomegalia, que também contribui para causar pancitopenia, particularmente trombocitopenia e anemia. Outra complicação da hematopoiese extramedular é a poiquilocitose, ou a presença de células sanguíneas vermelhas com formato anormal.

[317] O local principal de hematopoiese extramedular na mielofibrose é o baço, que normalmente está acentuadamente aumentado em pacientes que sofrem de mielofibrose. Como resultado do aumento acentuado do baço, frequentemente ocorrem múltiplos infartos subcapsulares no baço, o que significa que, em função do fornecimento de oxigênio interrompido para o baço, ocorre morte parcial ou completa de tecido. No nível celular, o baço contém precursores de células sanguíneas vermelhas, precursores de granulócitos e megacariócitos, com os megacariócitos proeminentes em seu número e em seus formatos anormais. Megacariócitos podem estar envolvidos na produção da fibrose secundária observada nessa condição.

[318] Foi sugerido que $TGF\beta$ pode estar envolvido no aspecto fibrótico da patogênese da mielofibrose (veja, por exemplo, Agarwal e cols., "Bone Marrow Fibrosis in Primary

Myelofibrosis: Pathogenic Mechanisms and the Role of TGF β " (2016) *Stem Cell Investig.* 3:5). A patologia da medula óssea na mielofibrose primária é caracterizada por fibrose, neoangiogênese e osteoesclerose, e a fibrose está associada a um aumento na produção de colágenos depositados na ECM.

[319] Foram descritos diversos biomarcadores, cujas variações são indicativas ou se correlacionam com a doença. Em algumas modalidades, os biomarcadores são marcadores celulares. Esses biomarcadores associados à doença são úteis para o diagnóstico e/ou monitoramento da progressão da doença, bem como da eficácia da terapia (por exemplo, responsividade dos pacientes à terapia). Esses biomarcadores incluem diversos marcadores fibróticos, bem como marcadores celulares. No câncer de pulmão, por exemplo, relata-se que as concentrações de TGF β 1 no fluido de lavagens broncoalveolares (BAL) este significativamente maiores em pacientes com câncer de pulmão, comparados com pacientes com doenças benignas (um aumento de aproximadamente 2 vezes), o que também pode servir como um biomarcador para diagnóstico e/ou monitoramento da progressão ou do tratamento dos efeitos do câncer de pulmão.

[320] Como a mielofibrose primária está associada ao desenvolvimento de megacariócito anormal, certos marcadores celulares de megacariócitos, bem como seus progenitores da linhagem da célula-tronco, podem servir como marcadores para diagnosticar e/ou monitorar a progressão da doença, bem como a eficácia da terapia. Em algumas modalidades, marcadores úteis incluem, sem limitação: marcadores celulares de megacariócitos diferenciados (por exemplo, CD41, CD42 e Tpo R), marcadores celulares de células progenitoras eritróides

de megacariócitos (por exemplo, CD34, CD38, e CD45RA-), marcadores celulares de células progenitoras mielóides comuns (por exemplo, IL-3 α /CD127, CD34, SCF R/c-kit e Flt-3/Flk-2), e marcadores celulares de células-tronco hematopoiéticas (por exemplo, CD34, CD38-, Flt-3/Flk-2). Em algumas modalidades, biomarcadores úteis incluem marcadores fibróticos. Esses incluem, sem limitação: TGF β 1, PAI-1 (também conhecido como Serpina 1), MCP-1 (também conhecido como CCL2), Colla1, Col3a1, FN1, CTGF, α -SMA, ACTA2, Timp1, Mmp8 e Mmp9. Em algumas modalidades, biomarcadores úteis são marcadores séricos (por exemplo, proteínas ou fragmentos encontrados e detectados em amostras de soro).

[321] Com base no achado de que TGF β é um componente do nicho da medula óssea leucêmica, é contemplado que o direcionamento ao microambiente da medula óssea de inibidores de TGF β pode ser uma abordagem promissora para reduzir células leucêmicas que expressam moléculas apresentadoras que regulam a disponibilidade local de TGF β no tecido afetado.

[322] Na verdade, em função da natureza multifacetada da patologia que se manifesta na desregulação TGF β -dependente em aspectos tanto mieloproliferativos quanto fibróticos (como o termo próprio "*mielofibrose*" sugere), inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo, podem fornecer efeitos terapêuticos particularmente vantajosos para pacientes que sofrem de mielofibrose. É contemplado que o braço de LTBP desse inibidor pode visar o complexo de TGF β 1 associado à ECM na medula óssea, enquanto o braço de LRRC33 do inibidor pode bloquear TGF β 1 associado à célula mielóide.

Além disso, a biologia anormal de megacariócitos associada à mielofibrose pode envolver atividades de TGF β 1 mediadas tanto por GARP quanto por LTBP. O inibidor de TGF β 1 isoforma-específico, contexto-permissivo é capaz de visar esses complexos inibindo, dessa forma, a liberação de TGF β 1 ativo no nicho.

[323] Dessa forma, esses inibidores de TGF β 1 são úteis para tratamento de pacientes com policitemia vera que tiveram uma resposta inadequada ou são intolerantes a outros tratamentos (ou ao padrão de atendimento), por exemplo, hidroxiuréia e inibidores de JAK. Esses inibidores também são úteis para o tratamento de pacientes com mielofibrose (MF) intermediária ou de alto risco, incluindo MF primária, MF pós-policitemia vera e MF pós-trombocitemia essencial.

[324] Consequentemente, um aspecto da invenção está relacionado aos métodos para o tratamento de mielofibrose primária. O método compreende a administração a um paciente que sofre de mielofibrose primária de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição que compreende um inibidor de TGF β que causa disponibilidade de TGF β reduzida. Em algumas modalidades, um anticorpo monoclonal inibidor da ativação de TGF β 1 isoforma-específico, contexto-permissivo, é administrado aos pacientes com mielofibrose. Esse anticorpo pode ser administrado em dosagens que variam entre 0,1 e 100 mg/kg, por exemplo, entre 1 e 30 mg, por exemplo, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, etc. Vias de administração preferidas de uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo é a administração intravenosa ou subcutânea. Quando a composição é administrada por via intravenosa, o paciente pode receber o

produto terapêutico ao longo de uma duração de tempo adequada, por exemplo, aproximadamente 60 minutos, por tratamento, e depois repetida a cada várias semanas, por exemplo, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas etc., por um total de vários ciclos, por exemplo, 4 ciclos, 6, ciclos, 8 ciclos, 10 ciclos, 12 ciclos etc. Em algumas modalidades, os pacientes são tratados com uma composição que compreende o anticorpo inibidor em um nível dose de 1-10 mg/kg (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 mg/kg) por meio de administração intravenosa a cada 28 dias (4 semanas) por 6 ciclos ou 12 ciclos. Em algumas modalidades, esse tratamento é administrado como uma terapia crônica (de longo prazo) (por exemplo, para ser continuada indefinidamente, desde que considerada benéfica), ao invés de suspender após um número definido de ciclos de administração.

[325] Em algumas modalidades, o inibidor de TGF β é um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste que se liga a um complexo de pró-TGF β inativo (por exemplo, latente) evitando, dessa forma, a liberação de TGF β ativo ou maduro pelo complexo, inibindo eficazmente a etapa de ativação. Em algumas modalidades, esse anticorpo ou porção de ligação ao antígeno se liga especificamente a um complexo de pró-TGF β que está associado com LRRC33, GARP, LTBP1, LTBP3 ou qualquer combinação destes. Em algumas modalidades, esse anticorpo ou porção de ligação ao antígeno especificamente se liga a um complexo de pró-TGF β aderido à célula. Em algumas modalidades, o anticorpo ou porção deste se liga seletivamente a um complexo de pró-TGF β que está associado com LRRC33 e/ou GARP (mas não com LTBP1 ou LTBP3). Em algumas modalidades, o anticorpo ou porção deste se liga

especificamente a um complexo de pró-TGF β que está associado com LRRC33. Em algumas modalidades, o anticorpo ou porção deste se liga especificamente a um complexo de pró-TGF β que está associado com GARP. Em algumas modalidades, o anticorpo ou porção deste se liga especificamente a um complexo de pró-TGF β que está associado com LRRC33, bem como a um complexo de pró-TGF β que está associado com GARP.

[326] Alternativamente ou adicionalmente às modalidades discutidas acima, o inibidor de TGF β é um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste que se liga à LRRC33 e/ou GARP e compreende um domínio para funções efetoras adicionais. Em algumas modalidades, o domínio para a função efetora adicional pode ser um domínio Fc ou Fc-*like* para mediar ADCC em células-alvo. De preferência, o anticorpo indutor de ADCC não desencadeia ou facilita a internalização, de modo a permitir suficientemente a morte da célula-alvo mediada por ADCC.

[327] Alternativamente ou adicionalmente às modalidades discutidas acima, o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste pode incluir uma porção adicional para efetuar “uma carga útil” de interesse (por exemplo, conjugados anticorpo-fármaco, ou ADC). Exemplos de carga útil adequada incluem, sem limitação: produtos terapêuticos/fármacos, toxinas, marcadores e marcadores de detecção/imageamento etc. Essa carga útil pode consistir em entidades químicas, pequenas moléculas, polipeptídeos, ácidos nucleicos, radioisótopos etc. De preferência, os anticorpos que são adequados para o mecanismo de ação mediado por ADC podem, mediante ligação à superfície da célula-alvo, desencadear internalização eficaz do complexo antígeno-anticorpo, de

modo a liberar a carga útil dentro da célula.

[328] Como a mielofibrose é uma doença progressiva que manifesta muitas facetas de patologia em múltiplos tecidos ou órgãos afetados, a abordagem terapêutica pode variar, dependendo da progressão da doença. Por exemplo, no local primário da doença (na medula óssea), é contemplado que a terapia adequada inclui um inibidor de LRRC33 descrito nesse relatório descritivo, que pode visar células hematopoiéticas que expressam LRRC33. Isso pode ser obtido por administração de uma composição que compreende um anticorpo que se liga a um complexo de pró-TGF β apresentado por LRRC33 e inibe a ativação de TGF β no paciente. Isso também pode ser obtido administração de uma composição que compreende um anticorpo que se liga a um LRRC33 e induz a morte de células-alvo no paciente. Alternativamente, essas abordagens podem ser combinadas para usar um anticorpo que é um inibidor da ativação de TGF β e também contém uma porção adicional para mediar citotoxicidade celular. Por exemplo, a porção adicional pode ser um domínio Fc ou Fc-like para induzir ADCC ou uma toxina conjugada ao anticorpo como uma carga útil (por exemplo, conjugados anticorpo-fármaco, ou ADC).

[329] Embora a mielofibrose possa ser considerada um tipo de leucemia, ela é caracterizada pela manifestação de fibrose. Como TGF β sabidamente regula aspectos da homeostasia da ECM, cuja desregulação pode levar à fibrose tecidual, é contemplado que, em algumas modalidades, é desejável inibir atividades de TGF β associadas à ECM. Consequentemente, anticorpos ou fragmentos destes que se ligam e inibem pró-TGF β apresentado por LTBP3 (por exemplo, LTBP1 e LTBP3) são englobados por essa invenção. Em algumas

modalidades, anticorpos ou fragmentos destes adequados ao tratamento de mielofibrose são "contexto-permissivos", na medida em que podem se ligar a múltiplos contextos do complexo de pró-TGF β , tais como aqueles associados com LRRC33, GARP, LTBP1, LTBP3, ou qualquer combinação destes. Em algumas modalidades, esse anticorpo é um inibidor da ativação de TGF β contexto-independente, caracterizado pelo fato de que o anticorpo pode se ligar e inibir qualquer um dos seguintes complexos latentes: LTBP1-pró-TGF β , LTBP3-pró-TGF β , GARP-pró-TGF β e LRRC33-pró-TGF β . Em algumas modalidades, esse anticorpo é um anticorpo isoforma-específico que se liga e inibe esses complexos latentes que compreendem uma isoforma, mas não as outras isoformas de TGF β . Esses incluem, por exemplo, LTBP1-pró-TGF β 1, LTBP3-pró-TGF β 1, GARP-pró-TGF β 1 e LRRC33-pró-TGF β 1. Em algumas modalidades, esse anticorpo é um anticorpo isoforma-seletivo que se liga e inibe preferencialmente uma ou mais isoformas de TGF β . É contemplado que anticorpos que podem inibir a ativação de TGF β 1 de uma forma contexto-permissiva ou contexto-independente são vantajosos para uso no tratamento de mielofibrose.

[330] Populações de pacientes de neoplasias mieloproliferativas adequadas que podem ser tratadas com as composições e métodos descritos nesse relatório descritivo podem incluir, sem limitação: a) uma população de pacientes que é Philadelphia (+); b) uma população de pacientes que é Philadelphia (-); c) uma população de pacientes que é categorizada como "clássica" (PV, ET e PMF); d) uma população de pacientes que carrega a mutação JAK2V617F(+); e) uma população de pacientes que carrega JAK2V617F(-); f) uma

população de pacientes com éxon JAK2 12(+); g) uma população de pacientes com MPL(+); e h) uma população de pacientes com CALR(+).

[331] Em algumas modalidades, a população de pacientes inclui pacientes com mielofibrose intermediária-2 ou de alto risco. Em algumas modalidades, a população de pacientes compreende indivíduos com mielofibrose que são refratários ou não candidatos à terapia disponível. Em algumas modalidades, o indivíduo possui contagens de plaquetas entre 100–200 $\times 10^9/L$. Em algumas modalidades, o indivíduo possui contagens de plaquetas $> 200 \times 10^9/L$ antes de receber o tratamento.

[332] Em algumas modalidades, um indivíduo para receber a administração (e que pode se beneficiar da administração) de uma terapia com inibidor de TGF β 1 contexto-permissivo isoforma-específico é diagnosticado com mielofibrose primária (PMF) intermediária-1 ou superior, ou mielofibrose essencial pós-policitemia vera/trombocitemia (MF pós-PV/ET). Em algumas modalidades, o indivíduo possui fibrose documentada da medula óssea antes do tratamento. Em algumas modalidades, o indivíduo possui MF-2 ou superior, como avaliada pela pontuação de graduação de consenso europeia e grau 3 ou superior pela escala de Bauermeister modificada antes do tratamento. Em algumas modalidades, o indivíduo possui o estado de desempenho da ECOG de 1 antes do tratamento. Em algumas modalidades, o indivíduo possui contagem de leucócitos ($10^9/L$) que varia entre 5 e 120 antes do tratamento. Em algumas modalidades, o indivíduo possui a carga do alelo *JAK2V617F* que varia entre 10–100%.

[333] Em algumas modalidades, um indivíduo para receber

a administração (e que pode se beneficiar da administração) de uma terapia com inibidor de TGF β 1 contexto-permissivo isoforma-específico é transfusão-dependente (antes do tratamento), caracterizado pelo fato de que o indivíduo possui uma história de pelo menos duas unidades de transfusões de células sanguíneas vermelhas no último mês para um nível de hemoglobina menor do que 8,5 g/dL que não está associado com sangramento clinicamente manifesto.

[334] Em algumas modalidades, um indivíduo para receber a administração (e que pode se beneficiar da administração) de uma terapia com inibidor de TGF β 1 contexto-permissivo isoforma-específico recebeu previamente uma terapia para tratar mielofibrose. Em algumas modalidades, o indivíduo foi tratado com uma ou mais terapias incluindo, sem limitação: AZD1480, panobinostat, EPO, IFN α , hidroxiuréia, interferon peguilado, talidomida, prednisona e inibidor de JAK2 (por exemplo, Lestaurtinib, CEP-701).

[335] Em algumas modalidades, o paciente possui hematopoiese extramedular. Em algumas modalidades, a hematopoiese extramedular é no fígado, pulmão, baço e/ou linfonodos. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica da presente invenção é administrada localmente a um ou mais dos locais localizados de manifestação da doença.

[336] O inibidor de TGF β 1 contexto-permissivo isoforma-específico é administrado aos pacientes em uma quantidade eficaz para tratar mielofibrose. A quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade suficiente para aliviar um ou mais sintomas e/ou complicações de mielofibrose em pacientes incluindo, sem limitação: deposição excessiva

de ECM no estroma da medula óssea, neoangiogênese, osteoesclerose, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia, sangramento, dor óssea e outra morbidade relacionada aos ossos, hematopoiese extramedular, trombocitose, leucopenia, caquexia, infecções, trombose e morte.

[337] Em algumas modalidades, a quantidade é eficaz para reduzir a expressão e/ou secreção de TGF β 1 (por exemplo, de células megacariocíticas) em pacientes. Esse inibidor pode, portanto, reduzir os níveis de mRNA de TGF β 1 em pacientes tratados. Em algumas modalidades, esse inibidor reduz os níveis de mRNA de TGF β 1 na medula óssea, por exemplo, em células mononucleares. Os pacientes com PMF tipicamente exibem níveis plasmáticos de TGF β 1 elevados acima de aproximadamente 2.500 pg/mL, por exemplo, acima de 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000 e 10.000 pg/mL (em contraste com faixas normais de aproximadamente 600–2.000 pg/mL, como medidas por ELISA) (veja, por exemplo, Mascarembas e cols. (*Leukemia & Lymphoma*, 2014, 55 (2): 450–452)). Zingariello (*Blood*, 2013, 121 (17): 3.345–3.363) quantificaram os teores de TGF β 1 bioativo e total no plasma de pacientes com PMF e em indivíduos de controle. De acordo com essa referência, o TGF β 1 bioativo mediano em pacientes com PMF foi de 43 ng/mL (variando entre 4–218 ng/mL) e TGF β 1 total foi de 153 ng/mL (32–1.000 ng/mL), enquanto nas contrapartes de controle, os valores foram de 18 (0,05–144) e 52 (8–860), respectivamente. Dessa forma, com base nesses relatos, os teores plasmáticos de TGF β 1 em pacientes com PMF estão elevados por várias vezes, por exemplo, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes etc., quando comparados com amostras de plasma de controle ou saudáveis.

O tratamento com o inibidor, por exemplo, após 4-12 ciclos de administração (por exemplo, 2, 4, 6, 8, 10, 12 ciclos) ou tratamento crônico ou de longo prazo, por exemplo, a cada 4 semanas, na dosagem de 0,1-100 mg/kg, por exemplo, 1-30 mg/kg de anticorpo monoclonal) descrito nesse relatório descritivo pode reduzir os níveis plasmáticos de TGF β 1 por pelo menos 10% em relação ao nível de base correspondente (pré-tratamento), por exemplo, pelo menos 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% e 50%.

[338] Alguns dos efeitos terapêuticos podem ser observados de forma relativamente rápida após o início do tratamento, por exemplo, após 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas ou 6 semanas. Por exemplo, o inibidor pode aumentar eficazmente o número de células-tronco e/ou de células precursoras dentro da medula óssea de pacientes tratados com o inibidor dentro de 1-8 semanas. Essas incluem células-tronco hematopoiéticas e células precursoras sanguíneas. Uma biópsia da medula óssea pode ser realizada para avaliar alterações nas frequências/número de células da medula. De forma correspondente, o paciente pode exibir sintomas melhorados como, por exemplo, dor óssea e fadiga.

[339] Uma das marcas morfológicas típicas de mielofibrose é a fibrose na medula óssea (por exemplo, no estroma da medula) caracterizada, em parte, por ECM aberrante. Em algumas modalidades, a quantidade é eficaz para reduzir deposição de colágeno excessiva, por exemplo, por células estromais mesenquimais. Em algumas modalidades, o inibidor é eficaz para reduzir o número de células CD41-positivas, por exemplo, megacariócitos, em indivíduos tratados, comparados com indivíduos de controle que não recebem o

tratamento. Em algumas modalidades, as frequências no nível de base de megacariócitos na medula óssea com PMF podem variar entre 200-700 células por milímetro quadrado (mm^2), e entre 40-300 megacariócitos por milímetro quadrado (mm^2) no baço com PMF, como determinado com cortes escolhidos aleatoriamente. Em contraste, as frequências de megacariócitos na medula óssea e baço de doadores normais não menores do que 140 e menores do que 10, respectivamente. O tratamento com o inibidor pode reduzir o número (por exemplo, frequências) de megacariócitos na medula óssea e/ou no baço. Em algumas modalidades, os tratamentos com o inibidor podem causar níveis reduzidos de sinalização efetora a jusante, por exemplo, fosforilação de SMAD2/3.

[340] Pacientes com mielofibrose podem sofrer de baço aumentado. Dessa forma, os efeitos clínicos de um produto terapêutico podem ser avaliados monitorando-se as alterações no tamanho do baço. O tamanho do baço pode ser examinado por técnicas conhecidas, por exemplo, avaliação do comprimento do baço por palpação e/ou avaliação do volume do baço por ultra-som. Em algumas modalidades, o indivíduo a ser tratado com um inibidor de TGF β 1 isoforma-específico, contexto-permissivo, possui um comprimento do baço no nível de base (antes do tratamento) de 5 cm ou maior, por exemplo, variando entre 5 e 30 cm, como avaliado por palpação. Em algumas modalidades, o indivíduo a ser tratado com um inibidor de TGF β 1 isoforma-específico, contexto-permissivo, possui um volume do baço no nível de base (antes do tratamento) de 300 ml ou maior, por exemplo, variando entre 300-1.500 mL, como avaliado por ultra-som. O tratamento com o inibidor, por exemplo, após 4-12 ciclos de administração (por exemplo, 2,

4, 6, 8, 10, 12 ciclos), por exemplo, a cada 4 semanas, na dosagem de 0,1-30 mg/kg de anticorpo monoclonal) descrito nesse relatório descritivo pode reduzir o tamanho do baço no indivíduo. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz do inibidor é suficiente para reduzir o tamanho do baço em uma população de pacientes que recebe o tratamento com inibidor por pelo menos 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 50% e 60%, em relação aos valores no nível de base correspondentes. Por exemplo, o tratamento é eficaz para obter uma redução $\geq 35\%$ no volume do baço desde o nível de base em 12-24 semanas, como medido por MRI (imageamento por ressonância nuclear magnética) ou varredura por TC (tomografia computadorizada), comparado com controle de placebo. Em algumas modalidades, o tratamento é eficaz para obter uma redução $\geq 35\%$ no volume do baço desde o nível de base em 24-48 semanas, como medido por MRI ou varredura por TC, comparado com a melhor terapia de controle disponível. A melhor terapia disponível pode incluir hidroxiuréia, glicocorticóides, bem como nenhuma medicação, anagrelida, epoetina alfa, talidomida, lenalidomida, mercaptopurina, tioguanina, danazol, peginterferon alfa-2a, interferon- α , melfalan, ácido acetilsalicílico, citarabina e colchicina.

[341] Em algumas modalidades, uma população de pacientes tratados com um inibidor de TGF β 1 contexto-permissivo isoforma-específico, tal como aquele descrito nesse relatório descritivo, mostra uma resposta ao tratamento estatisticamente aumentada, como avaliado, por exemplo, pelos critérios do "International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment" (IWG-MRT), grau de alteração no grau de fibrose da medula óssea medido pela

escala de Bauermeister modificada e pelo "European Consensus Grading System" após tratamento (por exemplo, 4, 6, 8 ou 12 ciclos), a resposta de sintomas usando o "Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form" (MPN-SAF).

[342] Em algumas modalidades, o tratamento com um inibidor de TGF β 1 contexto-permissivo isoforma-específico, tal como aquele descrito nesse relatório descritivo, obtém uma resposta ao tratamento estatisticamente aumentada, como avaliado, por exemplo, pelo "Myelofibrosis Symptom Assessment Form" (MFSAF) modificado, no qual os sintomas são medidos pela ferramenta MFSAF (por exemplo, Versão 2.0), um diário que captura os sintomas debilitantes de mielofibrose (desconforto abdominal, saciedade precoce, dor sob o gradil costal esquerdo, prurido, suores noturnos e dor óssea/muscular) usando uma escala de 0 a 10, em que 0 é ausente e 10 é a pior imaginável. Em algumas modalidades, o tratamento é eficaz para obter uma redução $\geq 50\%$ na pontuação total de total MFSAF desde o nível de base em, por exemplo, 12-24 semanas. Em algumas modalidades, uma fração significativa de pacientes que recebem a terapia obtém uma melhora de $\geq 50\%$ na Pontuação Total de Sintomas, comparados com pacientes que recebem placebo. Por exemplo, a fração do pool de pacientes para obter $\geq 50\%$ de melhora pode ser de mais de 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% ou 80%.

[343] Em algumas modalidades, a quantidade terapeuticamente eficaz do inibidor é uma quantidade suficiente para obter melhora clínica, como avaliada por uma resposta da anemia. Por exemplo, uma resposta da anemia melhorada pode incluir durações mais longas de independência de transfusão, por exemplo, 8 semanas ou mais, após o

tratamento de 4-12 ciclos, por exemplo, 6 ciclos.

[344] Em algumas modalidades, a quantidade terapeuticamente eficaz do inibidor é uma quantidade suficiente para manter doença estável por um período de tempo, por exemplo, 6 semanas, 8 semanas, 12 semanas, seis meses etc. Em algumas modalidades, a progressão da doença pode ser avaliada por alterações na celularidade global da medula óssea, no grau de fibrose de reticulina ou colágeno, e/ou uma alteração na carga do alelo *JAK2V617F*.

[345] Em algumas modalidades, uma população de pacientes tratados com um inibidor de TGF β 1 contexto-permissivo isoforma-específico, tal como aquele descrito nesse relatório descritivo, mostra sobrevida estatisticamente aumentada, comparada com uma população de controle que não recebe o tratamento. Por exemplo, em grupos de controle, a sobrevida mediana de pacientes com PMF é de aproximadamente seis anos (aproximadamente 16 meses em pacientes de alto risco), e espera-se que menos de 20% dos pacientes sobrevivam 10 anos ou mais pós-diagnóstico. O tratamento com o inibidor de TGF β 1 contexto-permissivo isoforma-específico, tal como aquele descrito nesse relatório descritivo, pode prolongar o tempo de sobrevida por pelo menos 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 30 meses, 36 meses ou 48 meses. Em algumas modalidades, o tratamento é eficaz para obter sobrevida global aumentada em 26 semanas, 52 semanas, 78 semanas, 104 semanas, 130 semanas, 144 semanas ou 156 semanas, comparado com pacientes que recebem placebo.

[346] Os benefícios clínicos da terapia, tais como aqueles exemplificados acima, podem ser observados em pacientes com ou sem anemia recém surgida.

[347] Uma das características vantajosas dos inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, é que eles mantêm perfis de segurança aprimorados gerados pela seletividade de isoforma, quando comparados com antagonistas de TGF β convencionais que não possuem a seletividade. Portanto, antecipa-se que o tratamento com um inibidor isoforma-específico, contexto-permissivo, como aquele descrito nesse relatório descritivo, possa reduzir eventos adversos em uma população de pacientes, em comparação com populações de pacientes equivalentes tratadas com antagonistas de TGF β convencionais, com relação à frequência e/ou gravidade desses eventos. Dessa forma, os inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, podem fornecer uma janela terapêutica maior quanto à dosagem e/ou duração de tratamento.

[348] Os eventos adversos podem ser graduados por métodos adequados reconhecidos na técnica, por exemplo, "Common Terminology Criteria for Adverse Events" (CTCAE), versão 4. Eventos adversos relatados previamente em pacientes humanos que receberam antagonistas de TGF β , por exemplo, GC1008, incluem: leucocitose (grau 3), fadiga (grau 3), hipóxia (grau 3), assistolia (grau 5), leucopenia (grau 1), lesões nodulares eritematosas da pele recorrentes, transitórias, sensíveis, dermatite supurativa e herpes zoster.

[349] A terapia com inibidor de TGF β 1 contexto-permissivo isoforma-específico pode causar eventos adversos (efeitos colaterais) menos frequentes e/ou menos severos, comparada com a terapia com inibidor de JAK em pacientes com mielofibrose, com relação, por exemplo, à anemia, trombocitopenia, neutropenia, hipercolesterolemia, alanina

transaminase (ALT) elevada, aspartato transaminase (AST) elevada, contusões, tonteados e dor de cabeça oferecendo, dessa forma, uma opção de tratamento mais segura.

[350] É contemplado que os inibidores da sinalização de TGF β 1 podem ser usados em conjunto com um ou mais produtos terapêuticos para o tratamento de mielofibrose como uma terapia combinada. Em algumas modalidades, um inibidor da ativação de TGF β 1 descrito nesse relatório descritivo é administrado aos pacientes que sofrem de mielofibrose, que receberam um inibidor de JAK1, inibidor de JAK2 ou inibidor de JAK1/JAK2. Em algumas modalidades, esses pacientes são responsivos à terapia com inibidor de JAK1, inibidor de JAK2 ou inibidor de inibidor de JAK1/JAK2, enquanto, em outras modalidades, esses pacientes são pouco responsivos ou não responsivos à terapia com inibidor de JAK1, inibidor de JAK2 ou inibidor de JAK1/JAK2. Em algumas modalidades, o uso de um inibidor de TGF β 1 isoforma-específico descrito nesse relatório descritivo pode tornar aqueles que são pouco responsivos ou não responsivos à terapia com inibidor de JAK1, inibidor de JAK2 ou inibidor de JAK1/JAK2 mais responsivos. Em algumas modalidades, o uso de um inibidor de TGF β 1 isoforma-específico descrito nesse relatório descritivo pode permitir dosagem reduzida do inibidor de JAK1, inibidor de JAK2 ou inibidor de JAK1/JAK2, que ainda produz eficácia clínica equivalente em pacientes, mas menos ou graus menores de toxicidades ou eventos adversos relacionados ao fármaco (por exemplo, aqueles listados acima). Em algumas modalidades, o tratamento com o inibidor da ativação de TGF β 1 descrito nesse relatório descritivo usado em conjunto com terapia com inibidor de JAK1, inibidor

de JAK2 ou inibidor de inibidor de JAK1/JAK2 pode produzir efeitos terapêuticos sinérgicos ou aditivos nos pacientes. Em algumas modalidades, o tratamento com o inibidor da ativação de TGF β 1 descrito nesse relatório descritivo pode reforçar os benefícios da terapia com inibidor de JAK1, inibidor de JAK2 ou inibidor de JAK1/JAK2 ou outra terapia dada para tratar mielofibrose. Em algumas modalidades, os pacientes podem adicionalmente receber um produto terapêutico para tratar a anemia associada à mielofibrose.

Câncer:

[351] Vários cânceres envolvem atividades de TGF β 1 e podem ser tratados com anticorpos e/ou composições da presente revelação. Como usado nesse relatório descritivo, o termo "câncer" se refere a qualquer uma de diversas neoplasias malignas caracterizadas pela proliferação de células anaplásicas que tendem a invadir tecido circundante e liberar metástases para novos locais do corpo, e também se refere à condição patológica caracterizada por esses crescimentos neoplásicos malignos. Os cânceres podem ser localizados (por exemplo, tumores sólidos) ou sistêmicos. No contexto da presente revelação, o termo "localizado" (como em "tumor localizado") se refere às anormalidades anatomicamente isoladas ou isoláveis, por exemplo, malignidades sólidas, ao contrário de doença sistêmica. Certos cânceres, por exemplo, certas leucemias (por exemplo, mielofibrose) e mieloma múltiplo, por exemplo, podem ter tanto um componente localizado (por exemplo, a medula óssea) quanto um componente sistêmico (por exemplo, células sanguíneas circulantes) para a doença. Em algumas modalidades, cânceres os podem ser sistêmicos, por exemplo,

maligñidades hematol3gicas. Os c3nceres que podem ser tratadas de acordo com a presente revela33o incluem, sem limita33o, todos os tipos de linfomas/Leucemias, carcinomas e sarcomas, tais como aqueles c3nceres ou tumores encontrados no 3nus, bexiga, ducto biliar, osso, c3rebro, mama, c3rvíce, c3lon/reto, endom3trio, es3fago, olho, ves3cula biliar, cabe3a e pesco3o, f3gado, rim, laringe, pulm3o, mediastino (t3rax), boca, ov3rios, p3ncreas, p3nis, pr3stata, pele, intestino delgado, est3mago, medula espinhal, c3ccix, test3culos, tireoide e 3tero. No c3ncer, TGF β (por exemplo, TGF β 1) pode ser promotor do crescimento ou inibidor do crescimento. Como um exemplo, em c3nceres pancre3ticos, tumores de SMAD4 do tipo selvagem podem apresentar crescimento inibido em resposta ao TGF β , mas 3 medida que a doen3a progride, receptor do tipo II ativado constitutivamente est3 tipicamente presente. Adicionalmente, h3 c3nceres pancre3ticos SMAD4-*null*. Em algumas modalidades, anticorpos, por33es de liga33o ao ant3geno destes e/ou composi33es da presente revela33o s3o projetados para visar seletivamente componentes das vias de sinaliza33o de TGF β que funcionam exclusivamente em uma ou mais formas de c3ncer. Leucemias, ou c3nceres do sangue ou da medula 3ssea que s3o caracterizados por uma prolifera33o anormal de c3lulas sangu3neas brancas, ou seja, leuc3citos, podem ser divididas em quatro classifica33es principais que incluem leucemia linfobl3stica aguda (ALL), leucemia linfoc3tica cr3nica (CLL), leucemia miel3gena aguda ou leucemia miel3ide aguda (AML) (AML com translocaliza33es entre o cromossomo 10 e 11 [410, 11]), cromossomo 8 e 21 [t(8;21)], cromossomo 15 e 17 [t(15;17)], e invers3es no cromossomo 16 [inv(16)]; AML com

displasia multilinhagens, que inclui pacientes que tiveram uma síndrome mielodisplásica (MDS) ou doença mieloproliferativa prévia que se transforma em AML; AML e síndrome mielodisplásica (MDS), relacionada à terapia, cuja categoria inclui pacientes que tiveram quimioterapia e/ou radiação prévia e subsequentemente desenvolvem AML ou MDS; d) AML não categorizada de outra forma, que inclui subtipos de AML que não se enquadram nas categorias acima; e e) leucemias agudas de linhagem ambígua, que ocorrem quando as células leucêmicas não podem ser classificadas como células mielóides ou linfóides, ou quando ambos os tipos de células estão presentes); e leucemia mielóide crônica (LMC).

[352] Os inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo, podem ser usados para tratar mieloma múltiplo. O mieloma múltiplo é um câncer de linfócitos B (por exemplo, células plasmáticas, plasmoblastos, células B de memória) que se desenvolve e expande na medula óssea, causando lesões ósseas destrutivas (ou seja, lesão osteolítica). Tipicamente, a doença apresenta reabsorção óssea osteoclástica aumentada, diferenciação de osteoblasto suprimida (por exemplo, parada da diferenciação) e formação óssea defeituosa, caracterizada, em parte, por lesões osteolíticas, osteopenia, osteoporose, hipercalcemia, bem como plasmocitoma, trombocitopenia, neutropenia e neuropatia. A terapia com inibidor TGF β 1-seletivo, contexto-permissivo, descrita nesse relatório descritivo pode ser eficaz para melhorar uma ou mais dessas manifestações clínicas ou sintomas em pacientes. O inibidor de TGF β 1 pode ser administrado aos pacientes que recebem terapia ou

terapias adicionais para tratar mieloma múltiplo, incluindo aquelas listadas em qualquer outro local nesse relatório descritivo. Em algumas modalidades, mieloma múltiplo pode ser tratado com um inibidor de TGF β 1 (por exemplo, um inibidor isoforma-específico, contexto-permissivo) em combinação com um inibidor de miostatina ou um inibidor de IL-6. Em algumas modalidades, o inibidor de TGF β 1 pode ser usado em conjunto com terapias tradicionais para mieloma múltiplo, por exemplo, bortezomib, lenalidomida, carfilzomib, pomalidomida, talidomida, doxorrubicina, corticosteróides (por exemplo, dexametasona e prednisona), quimioterapia (por exemplo, melfalan), radioterapia, transplante de célula-tronco, plitidepsina, Elotuzumab, Ixazomib, Masitinib e/ou Panobinostat.

[353] Os tipos de carcinomas que podem ser tratados pelos métodos da presente invenção incluem, sem limitação, papiloma/carcinoma, coriocarcinoma, tumor do seio endodérmico, teratoma, adenoma/adenocarcinoma, melanoma, fibroma, lipoma, leiomioma, rabdomioma, mesotelioma, angioma, osteoma, condroma, glioma, linfoma/Leucemia, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula pequena, carcinomas indiferenciados de célula grande, carcinoma de célula basal e carcinoma sinonasal indiferenciado.

[354] Os tipos de sarcomas incluem, sem limitação, sarcoma de tecido mole como, por exemplo, sarcoma alveolar de partes moles, angiossarcoma, dermatofibrossarcoma, tumor desmóide, tumor desmoplásico de célula redonda pequena, condrossarcoma extraesquelético, osteossarcoma extraesquelético, fibrossarcoma, hemangiopericitoma, hemangiossarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiossarcoma,

lipossarcoma, linfangiossarcoma, linfossarcoma, histiocitoma fibroso maligno, neurofibrossarcoma, rabdomiossarcoma, sarcoma sinovial e tumor de Askin, sarcoma de Ewing (tumor neuroectodérmico primitivo), hemangioendotelioma maligno, schwanoma maligno, osteossarcoma e condrossarcoma.

[355] Os inibidores da ativação de TGF β 1 isoforma-seletivos, contexto-permissivos/independentes, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo, podem ser adequados para o tratamento de malignidades que envolvem células originárias da crista neural. Cânceres da linhagem da crista neural (ou seja, tumores derivados da crista neural) incluem, sem limitação: melanoma (câncer de melanócitos), neuroblastoma (câncer de precursores simpáticos/adrenais), ganglioneuroma (câncer de gânglios do sistema nervoso periférico), carcinoma medular da tireóide (câncer de células C da tireóide), feocromocitoma (câncer de células de cromafina da medula adrenal) e MPNST (câncer das células de Schwann). Em algumas modalidades, os anticorpos e métodos da revelação podem ser usados para tratar um ou mais tipos de câncer ou condições relacionadas ao câncer que podem incluir, sem limitação, câncer do cólon, câncer renal, câncer de mama, melanoma maligno e glioblastomas (Schlingensiepen e cols., 2008; Ouhtit e cols., 2013).

[356] Linhas de evidência crescentes sugerem o papel de macrófagos na progressão de tumores/câncer. A presente invenção engloba a noção de que isso é, em parte, mediado por ativação de TGF β 1 no ambiente da doença, por exemplo, TME. Monócitos derivados da medula óssea (por exemplo, CD11b+) são recrutados para os locais de tumor em resposta

às citocinas/quimiocinas derivadas do tumor, onde monócitos passam por diferenciação e polarização para adquirir fenótipo pró-câncer (por exemplo, com tendência a M2, TAMs ou células TAM-like). Como demonstrado nos Exemplos fornecidos na presente revelação, monócitos isolados de PBMCs humanas podem ser induzidos a polarizar em subtipos de macrófagos diferentes, por exemplo, M1 (pró-fibrótico, anticâncer) e M2 (pró-câncer). A maioria dos TAMs em muitos tumores tem tendência a M2. Entre os macrófagos M2-like, foi verificado que os subtipos M2c e M2d, mas não M1, expressam LRRC33 elevado na superfície da célula. Além disso, macrófagos podem ainda ser inclinados ou ativados por exposição a uma M-CSF, resultando em um aumento acentuado na expressão de LRRC33, que coincide com a expressão de TGF β 1. M-CSF circulante aumentada (ou seja, concentrações séricas de M-CSF) em pacientes com doença mieloproliferativa (por exemplo, mielofibrose) também foi observada. Geralmente, tumores com alto infiltrado de macrófagos (TAM) e/ou MDSC estão associados com um prognóstico ruim. Similarmente, níveis elevados de M-CSF também são indicativos de prognóstico ruim.

[357] Como mencionado acima, inibidores da ativação de TGF β 1 contexto-permissivos/independentes podem ser usados no tratamento de melanoma. Os tipos de melanoma que podem ser tratados com esses inibidores incluem, sem limitação: lentigo maligno; melanoma-lentigo maligno; melanoma com disseminação superficial; melanoma lentiginoso acral; melanoma mucoso; melanoma nodular; melanoma polipóide e melanoma desmoplásico. Em algumas modalidades, o melanoma é um melanoma metastático.

[358] Mais recentemente, inibidores de *checkpoint* imune têm sido usados para tratar eficazmente pacientes com melanoma avançado. Em particular, anticorpos anti-morte programada (PD)-1 (por exemplo, nivolumab e pembrolizumab) se tornaram agora o padrão de atendimento para certos tipos de câncer como, por exemplo, melanoma avançado, que demonstraram atividade significativa e resposta durável com um perfil de toxicidade gerenciável. No entanto, a aplicação clínica eficaz de antagonistas de PD-1 é sobrecarregada por uma alta taxa de resistência inata (aproximadamente 60-70%) (veja Hugo e cols. (2016) *Cell* 165: 35-44), ilustrando que desafios permanentes continuam a incluir as questões de seleção de pacientes e previsores de resposta e resistência, bem como otimização de estratégias de combinação (Perrot e cols. (2013) *Ann. Dermatol.* 25(2): 135-144). Além disso, estudos sugeriram que aproximadamente 25% dos pacientes de melanoma que inicialmente responderam a uma terapia anti-PD-1 eventualmente desenvolveram resistência adquirida (Ribas e cols. (2016) *JAMA* 315: 1.600-9).

[359] O número de células T CD8+ infiltrantes no tumor que expressam PD-1 e/ou CTLA-4 parece ser um indicador crucial do sucesso com a inibição *checkpoint*, e o bloqueio tanto de PD-1 quanto de CTLA-4 pode aumentar as células T infiltrantes. Em pacientes com infiltração de macrófagos maior, no entanto, os efeitos anticâncer das células CD8 podem ser suprimidos.

[360] É contemplado que células que expressam LRRC33, por exemplo, células mielóides, incluindo precursores mielóides, MDSCs e TAMs, podem criar ou dar suporte a um ambiente imunossupressor (por exemplo, TME e medula óssea

mielofibrótica) por inibição de células T (por exemplo, depleção de células T), por exemplo, células T CD4 e/ou CD8, o que pode, pelo menos em parte, estar subjacente à resistência anti-PD-1 observada em certas populações de pacientes. Na verdade, evidências sugerem que a resistência à monoterapia anti-PD-1 era marcada por incapacidade de acumular células T citotóxica CD8+ e resgatar a proporção Teff/Treg. Notavelmente, os presentes inventores reconheceram que há uma bifurcação entre certos pacientes com câncer, por exemplo, uma população de pacientes com melanoma, com relação aos níveis de expressão LRRC33: um grupo exibe expressão elevada de LRRC33 (LRRC33^{elevado}), enquanto o outro grupo exibe expressão relativamente baixa de LRRC33 (LRRC33^{baixo}). Dessa forma, a invenção inclui a noção de que a população de pacientes LRRC33^{high} pode representar aqueles que são poucos responsivos ou resistentes à imunoterapia com inibidor de *checkpoint*. Consequentemente, agentes que inibem LRRC33, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo, podem ser particularmente benéficos para o tratamento de câncer como, por exemplo, melanoma, linfoma e distúrbios mieloproliferativos, que é resistente à terapia com inibidor de *checkpoint* (por exemplo, anti-PD-1).

[361] Em algumas modalidades, o câncer/tumor é intrinsecamente resistente ou não responsivo a um inibidor de *checkpoint* imune. Apenas como mais um exemplo, certos linfomas parecem pouco responsivos à inibição de *checkpoint* imune como, por exemplo, terapia anti-PD-1. Similarmente, um subconjunto da população de pacientes com melanoma sabidamente exibe resistência aos inibidores de *checkpoint*

imune. Sem se prender a uma teoria em particular, os inventores da presente revelação contemplam que isso pode ser, pelo menos parcialmente, causado por supra-regulação de vias de sinalização de TGF β 1, o que pode criar um microambiente imunossupressor onde inibidores de *checkpoint* não exercem seus efeitos. A inibição de TGF β 1 pode tornar esse câncer mais responsivo à terapia com inibidor de *checkpoint*. Exemplos não limitantes dos tipos de câncer que podem ser beneficiar de uma combinação de um inibidor de *checkpoint* imune e um inibidor de TGF β 1 incluem: mielofibrose, melanoma, carcinoma de célula renal, câncer da bexiga, câncer do cólon, malignidades hematológicas, carcinoma de célula não-pequena, câncer de pulmão de célula não-pequena (NSCLC), linfoma (de Hodgkin clássico e não-Hodgkin), câncer da cabeça e pescoço, câncer urotelial, câncer com instabilidade microsatélite elevada, câncer com deficiência do reparo de erro de pareamento, câncer gástrico, câncer renal e câncer hepatocelular. No entanto, qualquer câncer (por exemplo, pacientes com esse câncer) no qual TGF β 1 está superexpresso ou é a isoforma dominante em relação a TGF β 2/3, como determinado, por exemplo, por biópsia, pode ser tratado com um inibidor isoforma-seletivo de TGF β 1 de acordo com a presente revelação.

[362] Em algumas modalidades, um câncer/tumor se torna resistente ao longo do tempo. Esse fenômeno é referido como resistência adquirida ou resistência adaptiva. Como a resistência intrínseca, em algumas modalidades, a resistência adquirida é, pelo menos em parte, mediada por vias de TGF β 1-dependentes, e inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos descritos nesse relatório descritivo podem ser

eficazes na restauração da imunidade anticâncer nesses casos.

[363] Em algumas modalidades, a terapia combinada que compreende um inibidor de *checkpoint* imune e um inibidor de LRRC33 (por exemplo, aqueles descritos nesse relatório descritivo) pode ser eficaz para tratar esse câncer. Além disso, infiltrados de células altamente LRRC33-positivas em tumores, ou de algum outro modo locais/tecidos com proliferação celular anormal, podem servir como um biomarcador para imunossupressão do hospedeiro e resistência ao *checkpoint* imune. Similarmente, células T efectoras podem ser excluídas do nicho imunossupressor que limita a habilidade do corpo para combater o câncer. Além disso, como demonstrado na seção de Exemplos abaixo, Tregs que expressam TGF β 1 apresentado por GARP suprimem a proliferação de células T efectoras. Em conjunto, TGF β 1 é provavelmente um condutor crucial na geração e manutenção de um microambiente de doença inibidor imune (por exemplo, TME), e vários contextos de apresentação de TGF β 1 são relevantes para tumores. Em algumas modalidades, a terapia combinada pode obter proporções Teff/Treg mais favoráveis.

[364] Em algumas modalidades, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, que se ligam especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1, como descritos nesse relatório descritivo, podem ser usados em métodos para o tratamento de câncer em um indivíduo necessitado, o referido método compreendendo a administração do anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, ao indivíduo, de modo que o câncer é tratado. Em certas

modalidades, o câncer é câncer do cólon.

[365] Em algumas modalidades, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, que se ligam especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1, como descritos nesse relatório descritivo, podem ser usados em métodos para o tratamento de tumores sólidos. Em algumas modalidades, tumores sólidos podem ser tumores desmoplásicos, que são tipicamente densos e duros para que moléculas terapêuticas penetrem. Ao visar o componente da ECM desses tumores, esses anticorpos podem "afrouxar" o tecido denso do tumor para que se desintegre, facilitando o acesso do produto terapêutico para exercer seus efeitos anticâncer. Dessa forma, produtos terapêuticos adicionais, tais como quaisquer fármacos antitumorais conhecidos, podem ser usados em combinação.

[366] Adicionalmente ou alternativamente, anticorpos isoforma-específicos, contexto-permissivos, e fragmentos destes que são capazes de inibir a ativação de TGF β 1, tais como aqueles revelados nesse relatório descritivo, podem ser usados em conjunto com a tecnologia de célula T de receptor de antígeno quimérico ("CAR-T") como imunoterapia baseada em células, por exemplo, imunoterapia contra o câncer para o combate ao câncer.

[367] Em algumas modalidades, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, que se ligam especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1, como descritos nesse relatório descritivo, podem ser usados em métodos para inibição ou diminuição do crescimento de tumores

sólidos em um indivíduo que possui um tumor sólido, o referido método compreendendo a administração do anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, ao indivíduo, de modo que o crescimento de tumor sólido seja inibido ou diminuído. Em certas modalidades, o tumor sólido é um tumor de carcinoma do cólon. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, úteis para o tratamento de um câncer é um inibidor da ativação de TGF β 1 isoforma-específico, contexto-permissivo. Em algumas modalidades, esses anticorpos visam um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e um complexo LRRC33-TGF β 1. Em algumas modalidades, esses anticorpos visam um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1 e um complexo LTBP3-TGF β 1. Em algumas modalidades, esses anticorpos visam um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e um complexo LRRC33-TGF β 1. Em algumas modalidades, esses anticorpos visam um complexo GARP-TGF β 1 e um complexo LRRC33-TGF β 1.

[368] A invenção inclui o uso de inibidores de TGF β 1 contexto-permissivos (contexto-independentes), isoforma-específicos no tratamento de câncer que compreende um tumor sólido em um indivíduo. Em algumas modalidades, esse inibidor contexto-permissivo (contexto-independente), isoforma-específico, pode inibir a ativação de TGF β 1. Em modalidades preferidas, esse inibidor da ativação é um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste que se liga a um complexo de pró-TGF β 1. A ligação pode ocorrer quando o complexo está associado com qualquer uma das moléculas apresentadoras, por exemplo, LTBP1, LTBP3, GARP ou LRRC33 inibindo, dessa forma, a liberação de fator de crescimento TGF β 1 maduro pelo

complexo. Em algumas modalidades, o tumor sólido é caracterizado por ter estroma enriquecido com células T CD8+ que faz contato direto com CAFs e fibras de colágeno. Esse tumor pode criar um ambiente imunossupressor que evita que células imunes antitumorais (por exemplo, células T efetoras) infiltrem eficazmente o tumor, limitando a habilidade do corpo para combater o câncer. Ao invés disso, essas células podem se acumular dentro ou perto do estroma tumoral. Essas características podem tornar esses tumores pouco responsivos a uma imunoterapia com inibidor de *checkpoint*. Como discutido em mais detalhe abaixo, os inibidores de TGF β 1 revelados nesse relatório descritivo podem desbloquear a supressão de modo a permitir que células efetoras alcancem e matem células de câncer, por exemplo, usadas em conjunto com um inibidor de *checkpoint* imune.

[369] É contemplado que TGF β 1 desempenha papéis multifacetados em um microambiente tumoral, incluindo crescimento tumoral, supressão imune do hospedeiro, proliferação celular maligna, vascularidade, angiogênese, migração, invasão, metástase e quimiorresistência. Cada "contexto" apresentadora de TGF β 1 no ambiente pode, portanto, participar na regulação (ou desregulação) de progressão de doença. Por exemplo, o eixo de GARP é particularmente importante na resposta de Treg que regula a resposta de célula T efetora para mediação da resposta imune do hospedeiro para combater células de câncer. O eixo de LTBP1/3 pode regular a ECM, incluindo o estroma, onde fibroblastos associados ao câncer (CAFs) participam na patogênese e progressão do câncer. O eixo de LRRC33 pode desempenhar um papel crucial no recrutamento de monócitos

circulantes para o microambiente tumoral, diferenciação subsequente em macrófagos associados a tumores (TAMs), infiltração no tecido tumoral e exacerbação da doença.

[370] Em algumas modalidades, células que expressam TGF β 1 infiltram o tumor, criando um ambiente local imunossupressor. O grau pelo qual essa infiltração é observada pode se correlacionar com um prognóstico pior. Em algumas modalidades, uma infiltração maior é indicativa de resposta ao tratamento mais pobre a outra terapia de câncer, por exemplo, inibidores de *checkpoint* imune. Em algumas modalidades, células que expressam TGF β 1 no microambiente tumoral compreendem Tregs e/ou células mielóides. Em algumas modalidades, as células mielóides incluem, sem limitação: macrófagos, monócitos (residentes no tecido ou derivados da medula óssea), e MDSCs.

[371] Em algumas modalidades, células que expressam LRRC33 no TME são células supressoras de derivação mielóide (MDSCs). A infiltração de MDSC (por exemplo, infiltrado de tumor sólido) pode estar subjacente a pelo menos um mecanismo de escape imune, por criação de um nicho imunossupressor do qual as células imunes antitumorais do hospedeiro ficam excluídas. Evidências sugerem que MDSCs são mobilizadas por sinais associados à inflamação como, por exemplo, fatores inflamatórios associados ao tumor. Mediante mobilização, MDSCs podem influenciar efeitos imunossupressores por prejudicarem células que combatem doenças, por exemplo, células T CD8+ e células NK. Além disso, MDSCs podem induzir a diferenciação de Tregs por secreção de TGF β e IL-10. Dessa forma, um inibidor de TGF β 1 contexto-permissivo isoforma-específico, como aquele descrito nesse relatório descritivo,

pode ser administrado a pacientes com evasão imune (por exemplo, vigilância imune comprometida) para restaurar ou reforçar a habilidade do corpo para combater a doença (por exemplo, tumor). Como descrito em mais detalhe nesse relatório descritivo, isso pode aumentar ainda mais (por exemplo, restaurar ou potencializar) a responsividade ou sensibilidade do corpo a outra terapia, por exemplo, terapia de câncer.

[372] Em algumas modalidades, frequências elevadas (por exemplo, número) de MDSCs circulantes em pacientes são preditivas de baixa responsividade às terapias de bloqueio *checkpoint*, por exemplo, antagonistas de PD-1 e antagonistas de PD-L1. Por exemplo, estudos de biomarcadores mostraram que células supressoras de derivação mielóide (MDSC) HLA-DR10/CD14+/CD11b+ circulantes pré-tratamento estavam associadas com progressão e OS pior ($p = 0,0001$ e $0,0009$). Além disso, a resistência ao bloqueio de *checkpoint* PD-1 em carcinoma da cabeça e pescoço inflamado (HNC) se associa com expressão de marcadores de GM-CSF e células supressoras de derivação mielóide (MDSC). Essa observação sugeria que estratégias para depletar MDSCs, por exemplo, quimioterapia, deve ser considerada em combinação ou sequencialmente com anti-PD-1. Complexos LRRC33 ou LRRC33-TGF β representam um novo alvo para imunoterapia do câncer em função da expressão seletiva em células mielóides imunossupressoras. Portanto, sem se prender a uma teoria em particular, ter esse complexo como alvo pode aumentar a eficácia de terapias de padrão de atendimento com inibidor de *checkpoint* na população de pacientes.

[373] A invenção, portanto, fornece o uso de um inibidor

de TGF β 1 isoforma-específico, contexto-permissivo ou contexto-independente descrito nesse relatório descritivo para o tratamento de câncer que compreende um tumor sólido. Esse tratamento compreende a administração do inibidor de TGF β 1 isoforma-específico, contexto-permissivo ou contexto-independente, a um indivíduo diagnosticado com câncer que inclui pelo menos um tumor localizado (tumor sólido) em uma quantidade eficaz para tratar o câncer.

[374] Evidências sugerem que a progressão do câncer (por exemplo, proliferação/crescimento, invasão, angiogênese e metástase do tumor) pode ser, pelo menos em parte, dirigida pela interação tumor-estroma. Em particular, CAFs podem contribuir para esse processo por secreção de várias citocinas e fatores de crescimento e remodelagem da ECM. Fatores envolvidos no processo incluem, sem limitação, fator derivado de célula estromal 1 (SCD-1), MMP2, MMP9, MMP3, MMP-13, TNF- α , TGF β 1, VEGF, IL-6, M-CSF. Além disso, CAFs podem recrutar TAMs por secreção de fatores como, por exemplo, CCL2/MCP-1 e SDF-1/CXCL12 em um local de tumor; subsequentemente, é criado um nicho pró-TAM (por exemplo, áreas estromais enriquecidas em hialuronano) onde TAMs preferencialmente se aderem. Como foi sugerido que TGF β 1 promove a ativação de fibroblastos normais em CAFs miofibroblasto-*like*, a administração de um inibidor de TGF β 1 isoforma-específico, contexto-permissivo ou contexto-independente, como aquele descrito nesse relatório descritivo pode ser eficaz para se opor às atividades promotoras de câncer de CAFs. Na verdade, dados apresentados nesse relatório descritivo sugerem que um anticorpo isoforma-específico contexto-independente que bloqueia a

ativação de TGF β 1 pode inibir a supra-regulação induzida por UUO de genes de marcador como, por exemplo, CCL2/MCP-1, α -SMA. FN1 e Coll1, que também estão implicados em muitos cânceres.

[375] Em certas modalidades, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, que se ligam especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1, como descritos nesse relatório descritivo, são administrados a um indivíduo que possui câncer ou um tumor, isoladamente ou em combinação com um agente adicional, por exemplo, um anticorpo anti-PD-1 (por exemplo, um antagonista anti-PD-1). Outras terapias combinadas que estão incluídas na invenção são a administração de um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, descrito nesse relatório descritivo, com radiação, ou um quimioterápico. Agentes adicionais exemplares incluem, sem limitação, um antagonista de PD-1, um antagonista de PDL1, uma proteína de fusão de PD-L1 ou PDL2, um antagonista de CTLA4, um agonista de GITR, um anticorpo anti-ICOS, um anticorpo anti-ICOSL, um anticorpo anti-B7H3, um anticorpo anti-B7H4, um anticorpo anti-TIM3, um anticorpo anti-LAG3, um anticorpo anti-OX40, um anticorpo anti-CD27, um anticorpo anti-CD70, um anticorpo anti-CD47, um anticorpo anti-41BB, um anticorpo anti-PD-1, um anticorpo anti-CD20, um vírus oncolítico e um inibidor de PARP.

[376] Em algumas modalidades, a determinação ou seleção da abordagem terapêutica para terapia combinada que se adequa a tipos de câncer ou população de pacientes particulares pode envolver o seguinte: a) considerações em relação aos tipos de câncer para os quais uma terapia de padrão de

atendimento está disponível (por exemplo, indicações com imunoterapia aprovada); b) considerações em relação às subpopulações resistentes ao tratamento; e c) considerações em relação a cânceres/tumores que são "via de TGF β 1-ativos" ou, de outro modo, pelo menos em parte TGF β 1-dependentes (por exemplo, sensíveis à inibição de TGF β 1). Por exemplo, muitas amostras de câncer mostram que TGF β 1 é a isoforma predominante por, por exemplo, análise TCGA RNAseq. Em algumas modalidades, mais de 50% (por exemplo, mais de 50%, 60%, 70%, 80% e 90%) de amostras de cada tipo de tumor são positivas para expressão da isoforma TGF β 1. Em algumas modalidades, os cânceres/tumores que são "via de TGF β 1-ativos" ou, de algum outro modo, pelo menos em parte TGF β 1-dependentes (por exemplo, sensíveis à inibição de TGF β 1) contêm pelo menos uma mutação em Ras, por exemplo, mutações em K-ras, N-ras e/ou H-ras. Em algumas modalidades, o câncer/tumor compreende pelo menos uma mutação em K-ras.

[377] Em algumas modalidades, o inibidor de TGF β 1 contexto-permissivo isoforma-específico é administrado em conjunto com uma terapia com inibidor de *checkpoint* aos pacientes diagnosticados com câncer para os quais uma ou mais terapias com inibidor de *checkpoint* são aprovadas. Esses incluem, sem limitação: carcinoma urotelial da bexiga, carcinoma de célula escamosa (por exemplo, cabeça e pescoço), carcinoma de célula renal clara, carcinoma renal de célula papilar, carcinoma hepatocelular do fígado, adenocarcinoma pulmonar, melanoma cutâneo da pele e adenocarcinoma do estômago. Em modalidades preferidas, esses pacientes são pouco responsivos ou não responsivos à terapia com inibidor de *checkpoint*.

Papel de TGF β em condições musculoesqueléticas

[378] No músculo esquelético, que é composto pelos ossos do esqueleto, músculos, cartilagem, tendões, ligamentos, articulações e outro tecido conjuntivo que dão suporte e ligam tecidos e órgãos em conjunto, TGF β desempenha diversos papéis, incluindo inibição da proliferação e diferenciação, indução de atrofia e desenvolvimento de fibrose. TGF β reduz a proliferação celular satélite e evita a diferenciação (por meio da inibição de MyoD e miogenina) (Allen, R.E. e L.K. *J. Cell. Physiol.*, 1987. 133 (3): páginas 567-72; Brennan, T.J., e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991. 88 (9): páginas 3.822-6; Massague, J., e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1986. 83 (21): páginas 8.206-10; Olson, E.N., e cols., *J. Cell. Biol.*, 1986. 103 (5): páginas 1.799-805). A isoforma de TGF β (ou seja, TGF β 1, 2 ou 3) não é especificada nesses trabalhos iniciais, mas presume-se que seja TGF β 1. TGF β também contribui para a fibrose muscular; a injeção direta de TGF β 1 recombinante resulta em fibrose do músculo esquelético, e a pan-inibição de TGF β diminui a fibrose no músculo lesionado aguda e cronicamente (Li, Y., e cols., *Am. J. Pathol.*, 2004. 164 (3): páginas 1.007-19; Mendias, C.L., e cols., *Muscle Nerve*, 2012. 45 (1): páginas 55-9; Nelson, C.A., e cols., *Am. J. Pathol.*, 2011. 178 (6): páginas 2.611-21). TGF β 1 é expresso por miofibras, macrófagos, células T regulatórias, fibroblastos e fibrócitos dentro do músculo esquelético (Li, Y., e cols., *Am. J. Pathol.*, 2004. 164 (3): páginas 1.007-19; Lemos, D.R., e cols., *Nat. Med.*, 2015. 21 (7): páginas 786-94; Villalta, S.A., e cols., *Sci. Transl. Med.*, 2014. 6 (258): página 258ra142; Wang, X., e cols., *J. Immunol.*, 2016. 197 (12): páginas 4.750-4761); e a expressão

é aumentada mediante lesão e em doença (Li, Y., e cols., *Am. J. Pathol.*, 2004. 164 (3): páginas 1.007-19; Nelson, C.A., e cols., *Am. J. Pathol.*, 2011. 178 (6): páginas 2.611-21; Bernasconi, P., e cols., *J. Clin. Invest.*, 1995. 96 (2): páginas 1.137-44; Ishitobi, M., e cols., *Neuroreport*, 2000. 11 (18): páginas 4.033-5). TGF β 2 e TGF β 3 também estão supra-regulados (no nível de mRNA) no músculo mdx, embora em uma extensão menor do que TGF β 1 (Nelson, C.A., e cols., *Am. J. Pathol.*, 2011. 178 (6): páginas 2.611-21; Zhou, L., e cols., *Neuromuscul. Disord.*, 2006. 16 (1): páginas 32-8). Pessina, e cols., recentemente usaram experimentos de rastreamento de linhagem para mostrar que células de múltiplas origens dentro do músculo distrófico adotam um destino fibrogênico por meio de uma via TGF β -dependente (Pessina, P., e cols., *Stem Cell Reports*, 2015. 4 (6): páginas 1.046-60).

[379] O osso é o maior depósito de TGF β no corpo. Na verdade, acredita-se que a via de TGF β desempenhe um papel importante na homeostasia e remodelagem ósseas, pelo menos em parte, por regulação da diferenciação de osteoblasto e/ou reabsorção óssea osteoclástica. Esse processo está envolvido em situações normais e anormais, que, quando desregulado, pode causar ou exacerbar doença, por exemplo, condições e câncer relacionados aos ossos. Dessa forma, inibidores TGF β 1-seletivos tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo podem ser usados para tratar essas condições. Em algumas modalidades, a administração desses inibidores é eficaz para restaurar ou normalizar o equilíbrio formação-reabsorção óssea. Em algumas modalidades, o inibidor de TGF β 1 é administrado os indivíduos em conjunto com outra terapia, por exemplo, um inibidor de miostatina e/ou agentes de

reforço ósseo, como terapia combinada.

[380] Condições ósseas (por exemplo, doenças esqueléticas) incluem osteoporose, displasia e câncer ósseo. Além do câncer ósseo primário que se origina no osso, muitas malignidades são conhecidas por metastizar para os ossos; essas incluem, sem limitação, câncer de mama, câncer de pulmão (por exemplo, carcinoma de célula escamosa), câncer da tireóide, câncer testicular, carcinoma de célula renal, câncer de próstata e mieloma múltiplo.

[381] Em algumas modalidades, essas condições estão associadas à fraqueza muscular.

[382] TGF β 1 pode participar de condições fibróticas que acompanham inflamação crônica do tecido afetado, por exemplo, distrofias musculares humanas. A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença grave, progressiva e por fim fatal causada pela ausência de distrofina (Bushby, K., e cols., *Lancet Neurol.*, 2010. 9 (1): páginas 77-93). A ausência de distrofina resulta em suscetibilidade aumentada à lesão induzida por contração, levando à degeneração muscular contínua (Petrof, B.J., e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993. 90 (8): páginas 3.710-4; Dellorusso, C., e cols., *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 2001. 22 (5): páginas 467-75; Pratt, S.J., e cols., *Cell. Mol. Life Sci.*, 2015. 72 (1): páginas 153-64). Rodadas repetidas de reparo contribuem para a inflamação crônica, fibrose, exaustão do pool de células satélite, eventual perda de mobilidade e morte (Bushby, K., e cols., *Lancet Neurol.*, 2010. 9 (1): páginas 77-93; McDonald, C.M., e cols., *Muscle Nerve*, 2013. 48 (3): páginas 343-56). A expressão de TGF β 1 está significativamente aumentada em pacientes com DMD e se correlaciona com a

extensão de fibrose observada nesses pacientes (Bernasconi, P., e cols., *J. Clin. Invest.*, 1995. 96 (2): páginas 1.137-44; Chen, Y.W., e cols., *Neurology*, 2005. 65 (6): páginas 826-34). O depósito excessivo da ECM possui efeitos prejudiciais sobre as propriedades contráteis do músculo e pode limitar acesso à nutrição, na medida em que as miofibras são isoladas de sua irrigação sanguínea (Klingler, W., e cols., *Acta Myol.*, 2012. 31 (3): páginas 184-95). Recentemente, dados adicionais implicaram ainda mais TGF β 1 nas distrofias musculares. Foi verificado que variantes em LTBP4 modificam a gravidade da doença em camundongos e humanos. Em camundongos, uma variante de LTBP4 é protetora em camundongos que não possuem distrofina ou γ -sarcoglicano (Coley, W.D., e cols., *Hum. Mol. Genet.*, 2016. 25 (1): páginas 130-45; Heydemann, A., e cols., *J. Clin. Invest.*, 2009. 119 (12): páginas 3.703-12). Em humanos, dois grupos independentemente identificaram uma variante de LTBP4 como protetora na DMD, retardando a perda de deambulação por vários anos (Flanigan, K.M., e cols., *Ann. Neurol.*, 2013. 73 (4): páginas 481-8; van den Bergen, J.C., e cols., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2015. 86 (10): páginas 1.060-5). Embora a natureza das variantes genéticas em camundongos e humanos difira, em ambas as espécies da variante protetora resultam em sinalização de TGF β diminuída (Heydemann, A., e cols., *J. Clin. Invest.*, 2009. 119 (12): páginas 3.703-12); Ceco, E., e cols., *Sci. Transl. Med.*, 2014. 6 (259): página 259ra144). Muitas das funções de TGF β 1 na biologia do músculo esquelético foram deduzidas de experimentos nos quais o fator do crescimento ativo purificado é injetado em animais ou adicionado às células em cultura (Massague, J., e cols.,

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1986. 83 (21): páginas 8.206-10; Li, Y., e cols., *Am. J. Pathol.*, 2004. 164 (3): páginas 1007-19; Mendias, C.L., e cols., *Muscle Nerve*, 2012. 45 (1): páginas 55-9). Considerando a importância do contexto celular para funções específicas de TGF β 1 (veja, por exemplo, Hinck e cols., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2016. 8 (12)) é possível que alguns dos efeitos observados nesses experimentos não reflitam o papel (ou papéis) endógeno da citocina *in vivo*. Por exemplo, o tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com TGF β 1 recombinante, miostatina ou GDF11 resulta em alterações quase idênticas na expressão gênica nessas células, embora os papéis *in vivo* dessas proteínas sejam bem diferentes (Tanner, J.W., Khalil, A., Hill, J., Franti, M., MacDonnell, S.M., "Growth Differentiation Factor 11 Potentiates Myofibroblast Activation, in *Fibrosis: From Basic Mechanisms to Targeted Therapies*". 2016: Keystone, CO).

[383] Vários investigadores usaram inibidores de TGF β para esclarecer o papel do fator do crescimento *in vivo*. O tratamento de camundongos mdx com o pan-anticorpo neutralizante TGF β 1D11 nitidamente resulta em fibrose reduzida (por histologia e teor de hidroxiprolina), dano muscular reduzido (creatina quinase sérica reduzida e densidade de miofibras maior), e função muscular melhorada (por pletismografia, a geração de força por músculos EDL isolados, e força de apreensão da pata dianteira aumentada) (Nelson, C.A., e cols., *Am. J. Pathol.*, 2011. 178 (6): páginas 2.611-21; Andreetta, F., e cols., *J. Neuroimmunol.*, 2006. 175 (1-2): páginas 77-86; Gumucio, J.P., e cols., *J. Appl. Physiol.* (1985), 2013. 115 (4): páginas 539-45). Além

disso, a expressão miofibra-específica de um receptor de TGF β do tipo II negativo dominante protege contra danos musculares após lesão por cardiotoxina e em camundongos δ -sarcoglicano-/- (Accornero, F., e cols., *Hum. Mol. Genet.*, 2014. 23 (25): páginas 6.903-15). O proteoglicano decorina, que é abundante no músculo esquelético e inibe a atividade de TGF β , diminui a fibrose muscular em camundongos mdx e após lesão por laceração (Li, Y., e cols., *Mol. Ther.*, 2007. 15 (9): páginas 1.616-22; Gosselin, L.E., e cols., *Muscle Nerve*, 2004. 30 (5): páginas 645-53). Outras moléculas com atividade inibidora de TGF β y, por exemplo, suramina (um agente antineoplásico) e Losartanaa (um bloqueador do receptor de angiotensina) foram eficazes na melhora da patologia muscular e na redução de fibrose em modelos em camundongo de lesão, síndrome de Marfan e distrofia muscular (Spurney, C.F., e cols., *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, 2011. 16 (1): páginas 87-95; Taniguti, A.P., e cols., *Muscle Nerve*, 2011. 43 (1): páginas 82-7; Bedair, H.S., e cols., *Am. J. Sports Med.*, 2008. 36 (8): páginas 1.548-54; Cohn, R.D., e cols., *Nat. Med.*, 2007. 13 (2): páginas 204-10). Embora todos os agentes terapêuticos descritos acima realmente inibam TGF β 1 ou sua sinalização, nenhum deles é específico para a isoforma TGF β 1. Por exemplo, 1D11 se liga e inibe o TGF β 1, isoformas 2 e 3 (Dasch, J.R., e cols., *J. Immunol.*, 1989. 142 (5): páginas 1.536-41). Suramina inibe a habilidade de vários fatores do crescimento de se ligar aos seus receptores, incluindo PDGF, FGF e EGF, além de TGF β 1 (Hosang, M., *J. Cell. Biochem.*, 1985. 29 (3): páginas 265-73; Olivier, S., e cols., *Eur. J. Cancer*, 1990. 26 (8): páginas 867-71; Scher, H.I. e W.D. Heston, *Cancer Treat.*

Res., 1992. 59: páginas 131-51). Decorina também inibe a atividade de miostatina, tanto por ligação direta quanto por meio da supra-regulação de folistatina, um inibidor de miostatina (Miura, T., e cols., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006. 340 (2): páginas 675-80; Brandan, E., C. Cabello-Verrugio, e C. Vial, *Matrix Biol.*, 2008. 27 (8): páginas 700-8; Zhu, J., e cols., *J. Biol. Chem.*, 2007. 282 (35): páginas 25.852-63). Losartana afeta vias de sinalização adicionais por meio de seus efeitos sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona, incluindo a via IGF-1/AKT/mTOR (Burks, T.N., e cols., *Sci. Transl. Med.*, 2011. 3 (82): página 82ra37; Sabharwal, R. e M.W. Chapleau, *Exp. Physiol.*, 2014. 99 (4): páginas 627-31; McIntyre, M., e cols., *Pharmacol. Ther.*, 1997. 74 (2): páginas 181-94). Portanto, todas essas terapias inibem moléculas adicionais que podem contribuir para seus efeitos terapêuticos, bem como toxicidades.

[384] Considerando o papel de TGF β postulado na homeostasia, reparo e regeneração musculares, agentes, por exemplo, anticorpos monoclonais descritos nesse relatório descritivo, que modulam seletivamente a sinalização de TGF β 1 podem ser eficazes para o tratamento de fibras musculares danificadas, por exemplo, em distrofias musculares crônicas/genéticas e lesões musculares agudas, sem as toxicidades associadas com os inibidores de TGF β de ação mais ampla desenvolvidos até hoje.

[385] Consequentemente, a presente invenção fornece métodos para o tratamento de fibras musculares danificadas com o uso de um agente que modula preferencialmente um subconjunto, mas não todos, dos efeitos de TGF β *in vivo*.

Esses agentes podem modular seletivamente a sinalização de TGF β 1 ("modulação isoforma-específica").

Reparo de fibra muscular em doenças musculares crônicas

[386] A invenção engloba métodos para aumentar a qualidade e função musculares em pacientes com DMD, por limitação de fibrose e contribuindo para uma normalização da morfologia e função musculares. Como TGF β 1 também inibe a miogênese, o bloqueio de TGF β 1 pode promover a regeneração no músculo distrófico, adicionando ainda mais benefício terapêutico. Os inibidores de TGF β 1 podem ser usados em combinação com terapias de supra-regulação de distrofina, por exemplo, Exondys 51 (Eteplirsen). Considerando os benefícios terapêuticos potenciais da inibição de TGF β 1 na distrofia muscular, é crucial (1) diferenciar o papel (ou papéis) de TGF β 1 daqueles de TGF β 2 e TGF β 3, e (2) esclarecer em qual contexto (ou contextos) molecular a inibição de TGF β 1 seria a mais benéfica. Como mencionado acima, pan-inibidores de TGF β foram associados com toxicidades significantes, que limitam o uso clínico desses compostos (Anderton, M.J., e cols., *Toxicol Pathol.*, 2011. 39 (6): páginas 916-24; Stauber, A., e cols., *Clinical Toxicology*, 2014. 4 (3): páginas 1-10). É incerto quais das isoformas de TGF β causam essas toxicidades. Algumas das toxicidades descritas podem ser causadas pela inibição de TGF β 1 no sistema imune. Por exemplo, embora 1D11 reduzisse significativamente os níveis de fibrose no diafragma, o tratamento também aumentou os números de células T CD4⁺ e CD8⁺ no músculo, sugerindo uma resposta inflamatória aumentada mediante pan-inibição de TGF β que seria prejudicial com o tratamento de longo prazo (Andreetta, F., e cols., *J Neuroimmunol.*, 2006. 175 (1-2):

páginas 77-86). Na verdade, a depleção de células T do músculo melhora a patologia muscular de camundongos mdx, sugerindo que respostas inflamatórias mediadas por célula T são prejudiciais ao músculo distrófico (Spencer, M.J., e cols., *Clin. Immunol.*, 2001. 98 (2): páginas 235-43). Aumentos nos números de células T após administração de 1D11 são provavelmente causados pelos efeitos de TGF β 1 em células T reguladoras (Treg). Tregs apresentam TGF β 1 em sua superfície celular por meio de GARP, e a liberação de TGF β 1 por esse complexo aumenta a atividade supressiva de Treg limitando, dessa forma, a inflamação mediada por células T (Wang, R., e cols., *Mol. Biol. Cell.*, 2012. 23 (6): páginas 1.129-39; Edwards, J.P., A.M. Thornton e E.M. Shevach, *J. Immunol.*, 2014. 193 (6): páginas 2.843-9; Nakamura, K., e cols., *J. Immunol.*, 2004. 172 (2): páginas 834-42; Nakamura, K., A. Kitani e W. Strober, *J. Exp. Med.*, 2001. 194 (5): páginas 629-44). Na verdade, a depleção de Tregs usando o anticorpo PC61 resultou em inflamação e dano muscular aumentados no diafragma de camundongos mdx, enquanto o aumento dos números e atividade de Treg reduziu o dano muscular (Villalta, S.A., e cols., *Sci. Transl. Med.*, 2014. 6 (258): página 258ra142). Curiosamente, uma população adicional de células T imunossupressoras, células Tr1, foi recentemente identificada. Essas células produzem quantidades maiores de TGF β 3, o que é necessário para sua atividade supressiva (Gagliani, N., e cols., *Nat. Med.*, 2013. 19 (6): páginas 739-46; Okamura, T., e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2009. 106 (33): páginas 13.974-9; Okamura, T., e cols., *Nat. Commun.*, 2015. 6: página 6.329). Embora o papel de células Tr1 no músculo esquelético seja

desconhecido, existe a possibilidade de que a inibição de TGF β 1 e de TGF β 3 por 1D11 poderia ter efeitos pró-inflamatórios aditivos por inibição de células Tregs e Tr1.

[387] Os esclarecimentos estruturais descritos acima em relação à latência e ativação de TGF β 1 permitem novas abordagens para a descoberta de fármacos que visam especificamente a ativação de TGF β 1 (Shi, M., e cols., *Nature*, 2011. 474 (7.351): páginas 343-9). O alto grau de identidade de sequência compartilhado entre os três fatores do crescimento TGF β maduros não é compartilhado pelos complexos latentes, permitindo a descoberta de anticorpos que são perfeitamente específicos para pró-TGF β 1. Com o uso de abordagens proprietárias para a descoberta de anticorpos, os presentes inventores identificaram anticorpos (Ab1, Ab2 e Ab3) que se ligam especificamente a pró-TGF β 1 (veja, por exemplo, FIG. 4B). Com o uso de um sistema de cocultura *in vitro*, foi demonstrado que esses anticorpos inibem a liberação de TGF β 1 mediada por integrina. Nesse sistema, fibroblastos derivados da pele humana ou de músculos esqueléticos de camundongos são a fonte de TGF β 1 latente, uma linhagem de células que expressam α V β 6 permite a liberação de TGF β 1 ativo, que é então medido com o uso de uma terceira linhagem de células que expressam um repórter de luciferase responsivo a SMAD2/3 (FIGS. 7G-7H). Um desses anticorpos, Ab1, foi testado *in vivo* e demonstrou eficácia no modelo de UUO (obstrução ureteral unilateral) em camundongos de fibrose renal. Nesse modelo, o tratamento de camundongos (n = 10) com 9 mg/kg/semana de Ab1 evitou a supra-regulação de genes responsivos ao TGF β 1 (FIGS. 12A-12J) e reduziu a extensão de fibrose após lesão (por

coloração com Vermelho-Picrosirius) (FIG. 12K). Terapias TGF β 1-específicas podem ter eficácia e perfis de segurança aprimorados comparadas com pan-inibidores de TGF β , um aspecto crucial para uma terapêutica que seria usada a longo prazo como na população de DMD. Anticorpos inibidores de TGF β 1 podem ser usados para determinar se a inibição específica de TGF β 1 possui potencial como uma terapêutica para DMD ou outras doenças musculares, e para esclarecer o papel de TGF β 1 na regeneração do músculo esquelético.

Lesões crônicas vs. agudas de miofibras e seleção de terapêuticas ótimas

[388] No músculo normal, mas em regeneração após uma lesão aguda (por exemplo, lesão traumática a músculos ou neurônios motores de outro modo saudáveis), acredita-se que a infiltração inicial de macrófagos inflamatórios seja necessária para limpar o tecido danificado e secretar fatores (por exemplo, citocinas) necessários à ativação de células satélites. Subsequentemente, essas células mudam para o fenótipo M2 para dirigir a resolução da ferida.

[389] Em contraste, em condições crônicas, por exemplo, doenças que incluem DMD, os macrófagos pró-inflamatórios predominavam em todos os momentos, e aquela mudança para M2 não ocorre (ou pelo menos não eficientemente o bastante), e os macrófagos pró-inflamatórios continuam a dirigir a inflamação e o dano muscular. Na DMD, a via de NF κ B está perpetuamente ativa, resultando em inflamação constitutiva. Em algumas modalidades, portanto, um inibidor de NF κ B pode ser administrado aos pacientes com DMD a fim de reduzir a inflamação crônica.

[390] Dessa forma, em condições crônicas como, por

exemplo, DMD, o foco terapêutico pode ser no reparo muscular, ao contrário de regeneração muscular. Isso porque as fibras musculares na DMD estão danificadas, mas não destruídas – elas são danificadas por rasgos na membrana, desregulação do transporte de cálcio e dano do ROS pelos macrófagos. Em comparação, em casos de lesões a músculos saudáveis, o foco terapêutico pode estar na regeneração. Por exemplo, em modelos de cardiotoxina, as fibras musculares são mortas e devem ser regeneradas. Isso simula o processo de recuperação após uma lesão traumática, por exemplo, lesão por esmagamento.

[391] Evidências sugerem que LRRC33 é expresso em macrófagos peritoneais induzidos por tioglicolato, que possuem um fenótipo M2-*like* (caracterizado pelo fato de que eles expressam altos níveis de Arginase, no iNOS, e altos níveis de CD206).

[392] Em situações nas quais LRRC33 é expresso primariamente nas células M2 e nas quais sua apresentação de TGF β 1 ("contexto") é importante para os efeitos de pró-cicatrização de feridas dessas células, pode ser benéfico ativar TGF β 1 mediado por LRRC33 para promover reparo e/ou miogênese. Por outro lado, em situações nas quais LRRC33 também é expresso nas células M1 pró-inflamatórias, então pode ser benéfico inibir TGF β 1 mediado por LRRC33, considerando que a inflamação dirige a fibrose, especialmente em um ambiente distrófico, por exemplo, DMD. Dessa forma, a identificação da fonte/contexto de TGF β 1 associado a doença pode ser uma etapa importante na seleção do modulador correto da sinalização de TGF β , que informará qual nível de seletividade deve ser considerado (por exemplo,

moduladores de TGF β 1 contexto-permissivos, isoforma-específicos, ou moduladores de TGF β 1 contexto-específicos; inibidores ou ativadores de TGF β 1 etc.).

[393] Além da inflamação crônica, a marca registrada da DMD é fibrose excessiva e progressiva. Na doença avançada, a fibrose é tão grave que ela pode, na verdade, isolar fibras musculares individuais de sua irrigação sanguínea. Ela também altera as propriedades contráteis do músculo. Em pacientes humanos, há uma forte correlação entre a extensão de supra-regulação de TGF β 1 e fibrose, e uma forte ligação entre a extensão de fibrose e resultados finais negativos da mobilidade. Portanto, em algumas modalidades, inibidores de LTBP-pró-TGF β 1 podem ser administrados aos pacientes distróficos para a prevenção e/ou redução de fibrose para visar seletivamente os efeitos de TGF β 1 associados à ECM na doença. Em algumas modalidades, vários agentes isoforma-e/ou contexto-seletivos descritos nesse relatório descritivo podem ser empregados para obter a inibição da sinalização de TGF β 1 para evitar fibrose e promover a miogênese, mas sem que tenham efeitos indesejados sobre o sistema imune (por exemplo, por meio de GARP ou LRRC33).

Tratamentos, administração

[394] Para a prática do método revelado nesse relatório descritivo, uma quantidade eficaz da composição farmacêutica descrita acima pode ser administrada a um indivíduo (por exemplo, um humano) que necessita do tratamento por meio de uma via adequada, por exemplo, administração intravenosa, por exemplo, como um bolo ou por infusão contínua ao longo de um período de tempo, por via intramuscular, intraperitoneal, intra-cérebro-espinhal, subcutânea, intra-

articular, intra-sinovial, intratecal, oral, por inalação ou por via tópica. Nebulizadores disponíveis comercialmente para formulações líquidas, incluindo nebulizadores de jato e nebulizadores ultra-sônicos, são úteis para administração. Formulações líquidas podem ser nebulizadas diretamente e o pó liofilizado pode ser nebulizador após reconstituição. Alternativamente, anticorpos ou porções de ligação ao antígeno destes que se ligam especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 podem ser aerossolizados usando uma formulação de fluorcarbono e um inalador dosimetrado, ou inalados como um pó liofilizado e triturado.

[395] O indivíduo a ser tratado pelos métodos descritos nesse relatório descritivo podem ser um mamífero, mais preferivelmente um humano. Mamíferos incluem, sem limitação, animais de criação, animais de esporte, animais de estimação, primatas, cavalos, cães, gatos, camundongos e ratos. Um indivíduo humano que necessita do tratamento pode ser um paciente humano que possui, está em risco ou é suspeito de ter uma indicação relacionada ao TGF β , tais como aquelas observadas acima. Um indivíduo que possui uma indicação relacionada ao TGF β pode ser identificado por exame médico de rotina, por exemplo, testes laboratoriais, testes funcionais de órgãos, varreduras por TC, ou ultra-sons. Um indivíduo suspeito de ter qualquer indicação desse tipo pode exibir um ou mais sintomas da indicação. Um indivíduo em risco para a indicação pode ser um indivíduo que possui um ou mais dos fatores de risco para aquela indicação.

[396] Como usados nesse relatório descritivo, os termos "quantidade eficaz" e "dose eficaz" se referem a qualquer

quantidade ou dose de um composto ou composição que é suficiente para atender seu objetivo (ou objetivos) desejado, ou seja, uma resposta biológica ou medicinal desejada em um tecido ou indivíduo em uma proporção risco/benefício aceitável. Por exemplo, em certas modalidades da presente invenção, o objetivo desejado pode ser inibir a ativação de TGF β 1 *in vivo*, para obter um resultado final clinicamente significativo associado à inibição de TGF β 1. As quantidades eficazes variam, como reconhecido por aqueles habilitados na técnica, dependendo da condição particular que está sendo tratada, da gravidade da condição, dos parâmetros individuais do paciente, incluindo idade, condição física, tamanho, sexo e peso, da duração do tratamento, da natureza da terapia atual (se houver), da via de administração específica e de fatores semelhantes dentro do conhecimento e experiência do profissional de saúde. Esses fatores são bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica e podem ser abordados com, no máximo, experimentação de rotina. Prefere-se geralmente que uma dose máxima dos componentes individuais ou combinações destes seja usada, ou seja, a maior dose segura de acordo com uma avaliação médica sólida. Será subentendido por aqueles habilitados na técnica, no entanto, que um paciente pode insistir em uma dose menor ou uma dose tolerável por razões médicas, razões fisiológicas ou por praticamente quaisquer outras razões.

[397] Considerações empíricas, por exemplo, a meia-vida, geralmente contribuirão para a determinação da dosagem. Por exemplo, anticorpos que são compatíveis com o sistema imune humano, por exemplo, anticorpos humanizados ou anticorpos

totalmente humanos, podem ser usados para prolongar a meia-vida do anticorpo e para evitar que o anticorpo seja atacado pelo sistema imune do hospedeiro. A frequência de administração pode ser determinada e ajustada ao longo do ciclo de terapia, e é geralmente, mas não necessariamente, baseada no tratamento e/ou supressão e/ou melhora e/ou retardo de uma indicação relacionada ao TGF β . Alternativamente, formulações de liberação sustentada contínua de um anticorpo que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 podem ser adequadas. Diversas formulações e dispositivos para obtenção de liberação sustentada seriam evidentes para aqueles habilitados na técnica e estão dentro do escopo dessa revelação.

[398] Em um exemplo, dosagens para um anticorpo que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 como descrito nesse relatório descritivo podem ser determinadas empiricamente em indivíduos que receberam uma ou mais administrações do anticorpo. Os indivíduos recebem dosagens incrementais do antagonista. Para avaliar a eficácia, um indicador da indicação relacionada ao TGF β pode ser acompanhado. Por exemplo, métodos para medição de dano de miofibra, reparo de miofibra, níveis de inflamação no músculo e/ou níveis de fibrose no músculo são bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica.

[399] A presente invenção engloba o reconhecimento de que agentes capazes de modular a etapa de ativação de TGF β s de um modo isoforma-específico podem fornecer perfis de

segurança aprimorados quando usados como um medicamento. Consequentemente, a invenção inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno destes que se ligam e inibem especificamente a ativação de TGF β 1, mas não de TGF β 2 ou TGF β 3 conferindo, dessa forma, inibição específica da sinalização de TGF β 1 *in vivo* minimizando, ao mesmo tempo, os efeitos colaterais indesejados decorrentes da alteração da sinalização de TGF β 2 e/ou TGF β 3.

[400] Em algumas modalidades, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, como descritos nesse relatório descritivo, não são tóxicos quando administrados a um indivíduo. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, como descritos nesse relatório descritivo, exibem toxicidade reduzida quando administrados a um indivíduo comparados com um anticorpo que se liga especificamente tanto ao TGF β 1 quanto ao TGF β 2. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, como descritos nesse relatório descritivo, exibem toxicidade reduzida quando administrados a um indivíduo, comparados com um anticorpo que se liga especificamente tanto ao TGF β 1 quanto ao TGF β 3. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, como descritos nesse relatório descritivo, exibem toxicidade reduzida quando administrados a um indivíduo, comparados com um anticorpo que se liga especificamente ao TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3.

[401] Geralmente, para administração de qualquer um dos anticorpos descritos nesse relatório descritivo, uma dosagem candidata inicial pode ser cerca de 2 mg/kg. Para os objetivos da presente revelação, uma dosagem diária típica

pode variar de cerca de qualquer um 0,1 µg/kg até 3 µg/kg até 30 µg/kg até 300 µg/kg até 3 mg/kg, de 30 mg/kg até 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é mantido até que uma supressão desejada de sintomas ocorra ou até que níveis terapêuticos suficientes sejam obtidos para aliviar uma indicação relacionada ao TGFβ, ou um sintoma desta. Um regime de dosagem exemplar compreende a administração de uma dose inicial de cerca de 2 mg/kg, seguida por uma dose de manutenção semanal de cerca de 1 mg/kg do anticorpo, ou seguida por uma dose de manutenção de cerca de 1 mg/kg em semanas alternadas. No entanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis, dependendo do padrão de queda farmacocinética que o profissional deseja obter. Por exemplo, uma dosagem de uma-quatro vezes por semana é contemplada. Em algumas modalidades, uma dosagem que varia de cerca de 3 µg/mg até cerca de 2 mg/kg (por exemplo, cerca de 3 µg/mg, cerca de 10 µg/mg, cerca de 30 µg/mg, cerca de 100 µg/mg, cerca de 300 µg/mg, cerca de 1 mg/kg, e cerca de 2 mg/kg) pode ser usada. Experimentos farmacocinéticos demonstraram que a concentração sérica de um anticorpo revelado nesse relatório descritivo (por exemplo, Ab2) permanece estável por pelo menos 7 dias após administração em um modelo animal pré-clínico (por exemplo, um modelo em camundongo). Sem se prender a uma teoria particular, essa estabilidade pós-administração pode ser vantajosa, na medida em que o anticorpo pode ser administrado menos frequentemente mantendo, ao mesmo tempo, uma concentração sérica clinicamente eficaz no indivíduo ao qual o anticorpo é

administrado (por exemplo, um indivíduo humano). Em algumas modalidades, a frequência de dosagem é de uma vez por semana, a cada 2 semanas, a cada 4 semanas, a cada 5 semanas, a cada 6 semanas, a cada 7 semanas, a cada 8 semanas, a cada 9 semanas ou a cada 10 semanas; ou 1 vez por mês, a cada 2 meses ou a cada 3 meses, ou mais. O progresso dessa terapia é facilmente monitorado por técnicas e ensaios convencionais. O regime de dosagem (incluindo o anticorpo usado) pode variar ao longo do tempo.

[402] Em algumas modalidades, para um paciente adulto de peso normal, doses que variam de cerca de 0,3 até 5,00 mg/kg podem ser administradas. O regime de dosagem particular, por exemplo, a dose, momento e repetição, dependerá do indivíduo particular e da história médica daquele indivíduo, bem como das propriedades dos agentes individuais (por exemplo, da meia-vida do agente, e de outras considerações relevantes).

[403] Para os objetivos da presente revelação, a dosagem apropriada de um anticorpo que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 dependerá do anticorpo específico (ou composições deste) empregado, do tipo e gravidade da indicação, se o anticorpo é administrado para fins preventivos ou terapêuticos, de terapia prévia, da história clínica do paciente e da resposta ao antagonista, e a critério do médico assistente. Em algumas modalidades, um médico irá administrar um anticorpo que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1, até que seja alcançada uma dosagem que obtém o resultado desejado. A administração de um anticorpo que se

liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 pode ser contínua ou intermitente, dependendo, por exemplo, da condição fisiológica do receptor, se o objetivo da administração é terapêutico ou profilático, e de outros fatores conhecidos por aqueles habilitados na técnica. A administração de anticorpo que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 pode ser basicamente contínua ao longo de um período de tempo pré-selecionado ou pode ser em uma série de doses espaçadas, por exemplo, antes, durante ou depois do desenvolvimento de uma indicação relacionada ao TGF β .

[404] Como usado nesse relatório descritivo, o termo "tratamento" se refere à aplicação ou administração de uma composição que inclui um ou mais agentes ativos a um indivíduo, que possui uma indicação relacionada ao TGF β , um sintoma da indicação, ou uma predisposição para a indicação, com o objetivo de curar, cicatrizar, aliviar, alterar, remediar, melhorar, aprimorar ou afetar a indicação, o sintoma da indicação, ou a predisposição para a indicação.

[405] O alívio uma indicação relacionada ao TGF β com um anticorpo que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 inclui o retardo do desenvolvimento ou progressão da indicação, ou a redução da gravidade da indicação. O alívio da indicação não exige necessariamente resultados curativos. Como usado nesse relatório descritivo, o "retardo" do desenvolvimento de uma indicação associada com uma indicação relacionada ao TGF β significa postergar,

impedir, tornar mais lenta, retardar, estabilizar e/ou adiar a progressão da indicação. Esse retardo pode ser de comprimentos de tempo variáveis, dependendo da história da indicação e/ou dos indivíduos que estão sendo tratados. Um método que "retarda" ou alivia o desenvolvimento de uma indicação, ou retarda o surgimento da indicação, é um método que reduz a probabilidade de desenvolvimento de um ou mais sintomas da indicação em certo intervalo de tempo e/ou reduz a extensão dos sintomas em certo intervalo de tempo, quando comparado com a não utilização do método. Essas comparações se baseiam tipicamente em estudos clínicos, usando um número de indivíduos suficiente para gerar um resultado estatisticamente significativo.

[406] Camundongos DBA2/J possuem uma deleção de 40 pb no alelo de LTBP4. A desregulação da ECM à qual TGF β 1 latente está associado pode expor o epítipo ao qual Ab1 se liga. Pode haver doenças nas quais o epítipo ao qual Ab1 se liga fica exposto, e aquelas doenças podem ser oportunidades terapêuticas para Ab1 se a inibição de TGF β 1 estiver indicada.

Terapias combinadas

[407] A revelação ainda engloba composições farmacêuticas e métodos relacionados usados como terapias combinadas para o tratamento de indivíduos que podem se beneficiar da inibição de TGF β *in vivo*. Em qualquer uma dessas modalidades, esses indivíduos podem receber terapias combinadas que incluem uma primeira composição que compreende pelo menos um inibidor de TGF β , por exemplo, anticorpo ou porção de ligação ao antígeno deste, descrito nesse relatório descritivo, em conjunto com uma segunda

composição que compreende pelo menos uma terapêutica adicional destinada a tratar a mesma doença ou condição clínica ou uma doença ou condição clínica superposta. A primeira e segunda composições podem, ambas, atuar no mesmo alvo celular, ou em alvos celulares distintos. Em algumas modalidades, a primeira e segunda composições podem tratar ou aliviar o mesmo conjunto de sintomas ou aspectos de uma doença ou condição clínica ou conjunto de sintomas ou aspectos de uma doença ou condição clínica superpostos. Em algumas modalidades, a primeira e segunda composições podem tratar ou aliviar um conjunto separado de sintomas ou aspectos de uma doença ou condição clínica. Para dar apenas um exemplo, a primeira composição pode tratar uma doença ou condição associada à sinalização de $TGF\beta$, enquanto a segunda composição pode tratar inflamação ou fibrose associada com a mesma doença etc. Essas terapias combinadas podem ser administradas em conjunto entre elas. A frase "em conjunto com", no contexto de terapias combinadas, significa que os efeitos terapêuticos de uma primeira terapia podem se sobrepor temporariamente e/ou espacialmente com os efeitos terapêuticos de uma segunda terapia no indivíduo que recebe a terapia combinada. Dessa forma, as terapias combinadas podem ser formuladas como uma formulação única para administração concomitante, ou como formulações separadas, para administração sequencial das terapias.

[408] Em modalidades preferidas, terapias combinadas produzem efeitos sinérgicos no tratamento de uma doença. O termo "sinérgico" se refere aos efeitos que são maiores do que efeitos aditivos (por exemplo, maior eficácia) de cada monoterapia individual.

[409] Em algumas modalidades, terapias combinadas que compreendem uma composição farmacêutica descrita nesse relatório descritivo produzem eficácia que é equivalente, no geral, àquela produzida por outra terapia (por exemplo, monoterapia de um segundo agente), mas estão associadas com menos efeitos adversos indesejados ou toxicidade menos severa associada ao segundo agente, comparada com a monoterapia do segundo agente. Em algumas modalidades, essas terapias combinadas permitem uma dosagem menor do segundo agente, mas mantêm a eficácia global. Essas terapias combinadas podem ser particularmente adequadas para populações de pacientes nas quais um tratamento de longo prazo é recomendado e/ou que envolvem pacientes pediátricos.

[410] Consequentemente, a invenção fornece composições farmacêuticas e métodos para uso em terapias combinadas para a redução da ativação de proteína TGF β 1 e no tratamento ou prevenção de doenças ou condições associadas à sinalização de TGF β 1, como descrito nesse relatório descritivo. Consequentemente, os métodos ou as composições farmacêuticas ainda compreendem uma segunda terapia. Em algumas modalidades, a segunda terapia pode ser útil no tratamento ou prevenção de doenças ou condições associadas à sinalização de TGF β 1. A segunda terapia pode diminuir ou tratar pelo menos um sintoma(s) associado à doença visada. A primeira e segunda terapias podem exercer seus efeitos biológicos por mecanismos de ação similares ou não relacionados; ou uma ou tanto a primeira quanto a segunda terapia podem exercer seus efeitos biológicos por diversos mecanismos de ação.

[411] Deve ser subentendido que as composições farmacêuticas descritas nesse relatório descritivo podem ter

a primeira e segunda terapias no mesmo carreador farmacologicamente aceitável ou em um carreador farmacologicamente aceitável diferente para cada modalidade descrita. Deve ainda ser subentendido que a primeira e segunda terapias podem ser administradas simultaneamente ou sequencialmente dentro de modalidades descritas.

[412] Os (um ou mais) anticorpos anti-TGF β da invenção, ou porções de ligação ao antígeno destes, podem ser usados em combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Exemplos dos agentes terapêuticos adicionais que podem ser usados com um anticorpo anti-TGF β da invenção incluem, sem limitação: um modulador de um membro da superfamília TGF β , por exemplo, um inibidor de miostatina e um inibidor de GDF11; um agonista de VEGF; um agonista de IGF1; um agonista de FXR; um inibidor de CCR2; um inibidor de CCR5; um inibidor duplo de CCR2/CCR5; um inibidor de lisil oxidase-like-2; um inibidor de ASK1; um inibidor de Acetil-CoA Carboxilase (ACC); um inibidor de p38 quinase; Pirfenidona; Nintedanib; um inibidor de M-CSF (por exemplo, antagonista de receptor de M-CSF e agentes neutralizantes de M-CSF); um inibidor de MAPK (por exemplo, inibidor de Erk), um agonista ou antagonista *checkpoint* imune; um antagonista de IL-11; e antagonista de IL-6 e semelhantes. Outros exemplos dos agentes terapêuticos adicionais que podem ser usados com os inibidores de TGF β incluem, sem limitação, um inibidor de indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), um inibidor de tirosina quinase, inibidor de Ser/Thr quinase, um inibidor de quinase duplo-específico. Em algumas modalidades, esse agente pode ser um inibidor de PI3K, um inibidor de PKC ou um inibidor de JAK.

[413] Em algumas modalidades, o agente adicional é um inibidor de *checkpoint*. Em algumas modalidades, o agente adicional é selecionado do grupo que consiste em um antagonista de PD-1, um antagonista de PDL1, uma proteína de fusão de PD-L1 ou PDL2, um antagonista de CTLA4, um agonista de GITR, um anticorpo anti-ICOS, um anticorpo anti-ICOSL, um anticorpo anti-B7H3, um anticorpo anti-B7H4, um anticorpo anti-TIM3, um anticorpo anti-LAG3, um anticorpo anti-OX40, um anticorpo anti-CD27, um anticorpo anti-CD70, um anticorpo anti-CD47, um anticorpo anti-41BB, um anticorpo anti-PD-1, um vírus oncolítico e um inibidor de PARP.

[414] Em algumas modalidades, o agente adicional se liga a uma molécula de coestimulação de célula T, por exemplo, moléculas de coestimulação inibidoras e moléculas de coestimulação ativadoras. Em algumas modalidades, o agente adicional é selecionado do grupo que consiste em um anticorpo anti-CD40, um anticorpo anti-CD38, um anticorpo anti-KIR, um anticorpo anti-CD33, um anticorpo anti-CD137 e um anticorpo anti-CD74.

[415] Em algumas modalidades, a terapia adicional é radiação. Em algumas modalidades, o agente adicional é um agente quimioterápico. Em algumas modalidades, o agente quimioterápico é Taxol. Em algumas modalidades, o agente adicional é um agente antiinflamatório. Em algumas modalidades, o agente adicional inibe o processo de recrutamento de monócitos/macrófagos e/ou infiltração tecidual. Em algumas modalidades, o agente adicional é um inibidor da ativação da célula estrelada hepática. Em algumas modalidades, o agente adicional é um antagonista do receptor de quimiocina, por exemplo, antagonistas de CCR2 e

antagonistas de CCR5. Em algumas modalidades, esse antagonista do receptor de quimiocina é um antagonista específico duplo, por exemplo, um antagonista de CCR2/CCR5. Em algumas modalidades, o agente adicional a ser administrado como terapia combinada é ou compreende um membro da superfamília TGF β de fatores do crescimento ou reguladores destes. Em algumas modalidades, esse agente é selecionado de moduladores (por exemplo, inibidores e ativadores) de GDF8/miostatina e GDF11. Em algumas modalidades, esse agente é um inibidor da sinalização de GDF8/miostatina. Em algumas modalidades, esse agente é um anticorpo monoclonal que se liga especificamente a um complexo de miostatina pró/Latente e bloqueia a ativação de miostatina. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal que se liga especificamente a um complexo de miostatina pró/Latente e bloqueia a ativação de miostatina não se liga à miostatina madura, livre.

[416] Em algumas modalidades, uma terapia adicional compreende terapia com CAR-T.

[417] Essas terapias combinadas podem utilizar vantajosamente utilize dosagens menores dos agentes terapêuticos administrados evitando, dessa forma, possíveis toxicidades ou complicações associadas às várias monoterapias. Em algumas modalidades, o uso de um inibidor de TGF β 1 isoforma-específico descrito nesse relatório descritivo pode tornar aqueles que são pouco responsivos ou não responsivos a uma terapia (por exemplo, padrão de atendimento) mais responsivos. Em algumas modalidades, o uso de um inibidor de TGF β 1 isoforma-específico descrito nesse relatório descritivo pode permitir a dosagem reduzida da terapia (por exemplo, padrão de atendimento), que ainda

produz eficácia clínica equivalente em pacientes, mas menos ou graus menores de toxicidades ou eventos adversos relacionados ao fármaco.

Inibição da atividade de TGF β 1

[418] Os métodos da presente revelação incluem métodos de inibição da atividade de fator de crescimento TGF β 1 em um ou mais sistemas biológicos. Esses métodos podem incluir o contato de um ou mais sistemas biológicos com um anticorpo e/ou composição da revelação. Em alguns casos, esses métodos incluem a modificação do nível de fator do crescimento livre em um sistema biológico (por exemplo, em um nicho de células ou indivíduo). Anticorpos e/ou composições de acordo com esses métodos podem incluir, sem limitação, biomoléculas incluindo, sem limitação, proteínas recombinantes, complexos de proteína e/ou anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno destes, descritos nesse relatório descritivo.

[419] Em algumas modalidades, os métodos da presente revelação podem ser usados para reduzir ou eliminar a atividade do fator do crescimento, denominados "métodos de inibição" nesse relatório descritivo. Alguns desses métodos podem compreender a retenção de fator do crescimento maduro em um complexo de TGF β (por exemplo, um TGF β 1 complexado com GARP, LTBP1, LTBP3 e/ou LRRC33) e/ou promoção de reassociação de fator do crescimento em um complexo de TGF β . Em alguns casos, os métodos de inibição podem compreender o uso de um anticorpo que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1. De acordo com alguns métodos de inibição, um ou mais anticorpos de inibição são fornecidos.

[420] Em algumas modalidades, anticorpos, porções de

ligação ao antígeno destes, e composições da revelação podem ser usados para inibição da ativação de TGF β 1. Em algumas modalidades, é fornecido neste relatório descritivo um método para inibição da ativação de TGF β 1 que compreende a exposição de um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 a um anticorpo, uma porção de ligação ao antígeno deste, ou a uma composição farmacêutica descrita nesse relatório descritivo. Em algumas modalidades, o anticorpo, porção de ligação ao antígeno deste, ou composição farmacêutica, inibe a liberação de TGF β 1 maduro pelo complexo GARP-TGF β 1, pelo complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1, e/ou o complexo LRRC33-TGF β 1. Em algumas modalidades, o método é realizado *in vitro*. Em algumas modalidades, o método é realizado *in vivo*. Em algumas modalidades, o método é realizado *ex vivo*.

[421] Em algumas modalidades, o complexo GARP-TGF β 1 ou o complexo LRRC33-TGF β 1 está presente na superfície externa de uma célula.

[422] Em algumas modalidades, a célula que expressa o complexo GARP-TGF β 1 ou o complexo LRRC33-TGF β 1 é uma célula T, um fibroblasto, um miofibroblasto, um macrófago, um monócito, uma célula dendrítica, uma célula apresentadora de antígeno, um neutrófilo, uma célula supressora de derivação mielóide (MDSC), um linfócito, um mastócito ou uma microglia. A célula T pode ser uma célula T regulatória (por exemplo, célula T imunossupressora). O neutrófilo pode ser um neutrófilo ativado. O macrófago pode ser um macrófago ativado (por exemplo, polarizado), incluindo macrófagos pró-fibróticos e/ou associados a tumores (TAM), por exemplo,

macrófagos do subtipo M2c e do subtipo M2d. Em algumas modalidades, os macrófagos são expostos a fatores derivados de tumor (por exemplo, citocinas, fatores de crescimento etc.) que podem induzir ainda mais fenótipos pró-câncer em macrófagos. Em algumas modalidades, esse fator derivado de tumor é CSF-1/M-CSF.

[423] Em algumas modalidades, a célula que expressa o complexo GARP-TGF β 1 ou o complexo LRRC33-TGF β 1 é uma célula de câncer, por exemplo, células de câncer e células tumorais circulantes.

[424] Em algumas modalidades, o complexo LTBP1-TGF β 1 ou o complexo LTBP3-TGF β 1 está ligado a uma matriz extracelular (ou seja, componentes da ECM). Em algumas modalidades, a matriz extracelular compreende fibrilina e/ou fibronectina. Em algumas modalidades, a matriz extracelular compreende uma proteína que compreende um motivo RGD.

[425] LRRC33 é expresso em tipos seletivos de células, em particular naqueles da linhagem mielóide, incluindo monócitos e macrófagos. Monócitos se originam de progenitores na medula óssea e circulam na corrente sanguínea e alcançam tecidos periféricos. Monócitos circulantes podem então migrar para dentro de tecidos onde ficam expostos ao ambiente local (por exemplo, tecido-específicos, associados à doença etc.) que inclui um painel de vários fatores, por exemplo, citocinas e quimiocinas, desencadeando a diferenciação de monócitos em macrófagos, células dendríticas etc. Esses incluem, por exemplo, macrófagos alveolares no pulmão, osteoclastos na medula óssea, microglia no sistema nervoso central (SNC), histiócitos em tecidos conjuntivos, células de Kupffer no fígado, e

macrófagos de tecido adiposo marrom em tecidos adiposos marrons. Em um tumor sólido, macrófagos infiltrados podem ser macrófagos associados a tumores (TAMs), neutrófilos associados a tumores (TANs), e células supressoras de derivação mielóide (MDSCs) etc. Esses macrófagos podem ativar e/ou estarem associados com fibroblastos ativados, por exemplo, fibroblastos carcinoma-associados (ou câncer-associados) (CAFs) e/ou ao estroma. Dessa forma, os inibidores da ativação de TGF β 1 descritos nesse relatório descritivo que inibem a liberação de TGF β 1 maduro por complexos que contêm LRRC33 podem visar qualquer uma dessas células que expressam LRRC33-pró-TGF β 1 na superfície da célula.

[426] Em algumas modalidades, o complexo LRRC33-TGF β 1 está presente na superfície externa de macrófagos pró-fibróticos (M2-*like*). Em algumas modalidades, os macrófagos pró-fibróticos (M2-*like*) estão presentes no microambiente fibrótico. Em algumas modalidades, o direcionamento ao complexo LRRC33-TGF β 1 na superfície externa de macrófagos pró-fibróticos (M2-*like*) fornece um efeito superior comparado exclusivamente com o direcionamento aos complexos LTBP1-TGF β 1 e/ou complexos LTBP1-TGF β 1. Em algumas modalidades, macrófagos M2-*like* são ainda polarizados em vários subtipos com fenótipos diferenciais, por exemplo, macrófagos M2c e M2d TAM-*like*. Em algumas modalidades, macrófagos se tornam ativados por vários fatores (por exemplo, fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas e moléculas de remodelagem da ECM) presentes no microambiente tumoral incluindo, sem limitação, TGF β 1, CCL2 (MCP-1), CCL22, SDF-1/CXCL12, M-CSF (CSF-1), IL-6, IL-8, IL-10, IL-

11, CXCR4, VEGF, PDGF, agentes reguladores de prostaglandina como, por exemplo, ácido araquidônico e ciclooxigenase-2 (COX-2), proteína relacionada ao hormônio da paratireóide (PTHrP), RUNX2, HIF1 α e metaloproteinases. Exposições a um ou mais desses fatores podem ainda conduzir monócitos/macrófagos a fenótipos pró-tumorais. Por sua vez, essas células associadas a tumores ativadas também podem facilitar o recrutamento e/ou diferenciação de outras células em células pró-tumorais, por exemplo, CAFs, TANS, MDSCs e semelhantes. Células estromais também podem responder à ativação de macrófagos e afetar a remodelagem da ECM e, por fim, a vascularização, invasão e metástase.

[427] Em algumas modalidades, o complexo GARP-TGF β 1, o complexo LTBP1-TGF β 1, o complexo LTBP3-TGF β 1, e/ou o complexo LRRC33-TGF β 1 está ligado a uma matriz extracelular. Em algumas modalidades, a matriz extracelular compreende fibrilina. Em algumas modalidades, a matriz extracelular compreende uma proteína que compreende um motivo RGD.

[428] Em algumas modalidades, é fornecido neste relatório descritivo um método para redução da ativação de proteína TGF β 1 em um indivíduo, que compreende a administração de um anticorpo, uma porção de ligação ao antígeno deste, ou uma composição farmacêutica descrita nesse relatório descritivo ao indivíduo reduzindo, dessa forma, a ativação de proteína TGF β 1 no indivíduo. Em algumas modalidades, o indivíduo possui ou está em risco de ter fibrose. Em algumas modalidades, o indivíduo possui ou está em risco de ter câncer. Em algumas modalidades, o indivíduo possui ou está em risco de ter demência.

[429] Em algumas modalidades, os anticorpos, ou as

porções de ligação ao antígeno destes, como descritos nesse relatório descritivo, reduzem a atividade supressora de células T regulatórias (Tregs).

Kits para uso no alívio de doenças/distúrbios associados com uma indicação relacionada ao TGF β

[430] A presente revelação também fornece kits para uso no alívio de doenças/distúrbios associados a uma indicação relacionada ao TGF β . Esses kits podem incluir um ou mais recipientes que compreendem um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1, por exemplo, qualquer um daqueles descritos nesse relatório descritivo.

[431] Em algumas modalidades, o kit pode compreender instruções para uso de acordo com qualquer um dos métodos descritos nesse relatório descritivo. As instruções incluídas podem compreender uma descrição da administração do anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 para tratar, retardar o surgimento ou aliviar uma doença-alvo, tais como aquelas descritas nesse relatório descritivo. O kit pode ainda compreender uma descrição da seleção de um indivíduo adequado para tratamento com base na identificação se aquele indivíduo tem a doença-alvo. Ainda em outras modalidades, as instruções compreendem uma descrição da administração de um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, a um indivíduo em risco da doença-alvo.

[432] As instruções relacionadas ao uso de anticorpos,

ou porções de ligação ao antígeno destes, que se ligam especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 geralmente incluem informação quanto à dosagem, posologia de dosagem e via de administração para o tratamento desejado. Os recipientes podem ser doses unitárias, embalagens a granel (por exemplo, embalagens multidoses) ou doses subunitárias. As instruções fornecidas nos kits da revelação são tipicamente instruções escritas em um rótulo ou bula (por exemplo, uma folha de papel incluída no kit), mas instruções legíveis por máquina (por exemplo, instruções em um disco de armazenamento magnético ou óptico) também são aceitáveis.

[433] O rótulo ou bula indica que a composição é usada para o tratamento, retardo do surgimento e/ou alívio de uma doença ou distúrbio associado a uma indicação relacionada ao TGF β . Podem ser fornecidas instruções para a prática de qualquer um dos métodos descritos nesse relatório descritivo.

[434] Os kits dessa revelação estão em uma embalagem adequada. Uma embalagem adequada inclui, sem limitação, frascos, garrafas, jarras, embalagem flexível (por exemplo, bolsas de Mylar ou plásticas lacradas), e semelhantes. Também são contempladas embalagens para uso em combinação com um dispositivo específico, por exemplo, um inalador, dispositivo de administração nasal (por exemplo, um atomizador) ou um dispositivo de infusão como, por exemplo, uma minibomba. Um kit pode ter uma entrada de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um frasco que possui uma tampa perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). O recipiente também pode

ter uma entrada de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um frasco que possui uma tampa perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). Pelo menos um agente ativo na composição é um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno deste, que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo.

[435] Os kits podem opcionalmente fornecer componentes adicionais como, por exemplo, tampões e informação interpretativa. Normalmente, o kit compreende um recipiente e um rótulo ou bula(s) sobre ou associado ao recipiente. Em algumas modalidades, a revelação fornece artigos manufaturados que compreendem o conteúdo dos kits descritos acima.

Ensaaios para detecção de um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1

[436] Em algumas modalidades, os métodos e composições fornecidos nesse relatório descritivo estão relacionados a um método para detecção de um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 em uma amostra obtida de um indivíduo. Como usado nesse relatório descritivo, um "indivíduo" se refere a um organismo individual, por exemplo, um mamífero individual. Em algumas modalidades, o indivíduo é um humano. Em algumas modalidades, o indivíduo é um mamífero não humano. Em algumas modalidades, o indivíduo é um primata não humano. Em algumas modalidades, o indivíduo é um roedor. Em algumas

modalidades, o indivíduo é um carneiro, uma cabra, gado, aves de criação, um gato ou um cão. Em algumas modalidades, o indivíduo é um vertebrado, um anfíbio, um réptil, um peixe, um inseto, uma mosca ou um nematódeo. Em algumas modalidades, o indivíduo é um animal de pesquisa. Em algumas modalidades, o indivíduo é modificado geneticamente, por exemplo, um indivíduo não humano modificado geneticamente. O indivíduo pode ser de qualquer sexo e em qualquer estágio de desenvolvimento. Em algumas modalidades, o indivíduo é um paciente ou um voluntário saudável.

[437] Em algumas modalidades, um método para detecção de um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 em uma amostra obtida de um indivíduo envolve (a) o contato da amostra com um anticorpo que se liga especificamente a um complexo GARP-TGF β 1, um complexo LTBP1-TGF β 1, um complexo LTBP3-TGF β 1 e/ou um complexo LRRC33-TGF β 1 sob condições adequadas à ligação do anticorpo ao antígeno, caso o antígeno esteja presente na amostra formando, dessa forma, complexos de ligação; e (b) determinação do nível do anticorpo ligado ao antígeno (por exemplo, determinação do nível dos complexos de ligação).

[438] Em uma modalidade, um ensaio de triagem que utiliza complexos de TGF β 1 latente biotinilados imobilizados sobre uma superfície, o que permite a ativação de TGF β latente por integrinas por fornecimento de uma amarra. Outros ativadores, não integrina, também poderiam ser testados naquele sistema. A leitura pode ser por meio de células repórteres ou outras respostas celulares TGF β -dependentes.

Ensaio baseado em células para medição da ativação de TGF β

[439] A ativação de TGF β (e sua inibição por um inibidor

de TGF β de teste, por exemplo, um anticorpo) pode ser medida por qualquer método adequado conhecido na técnica. Por exemplo, a ativação de TGF β mediada por integrina pode ser utilizada em um ensaio baseado em células, por exemplo, o ensaio de luciferase "CAGA12", descrito em mais detalhe nesse relatório descritivo. Como mostrado, um sistema de ensaio desse tipo pode compreender os seguintes componentes: i) uma fonte de TGF β (recombinante, endógena ou transfectada); ii) uma fonte de ativador, por exemplo, integrina (recombinante, endógena ou transfectada); e iii) um sistema-repórter que responde à ativação de TGF β , por exemplo, células que expressam receptores de TGF β capazes de responder ao TGF β e traduzir o sinal em uma saída legível (por exemplo, atividade de luciferase em células CAGA12 ou outras linhagens de células repórteres). Em algumas modalidades, a linhagem de célula-repórter compreende um gene-repórter (por exemplo, um gene de luciferase) sob o controle de um promotor responsivo ao TGF β (por exemplo, um promotor PAI-1). Em algumas modalidades, certos elementos promotores que conferem sensibilidade podem ser incorporados no sistema-repórter. Em algumas modalidades, esse elemento promotor é o elemento de CAGA12. Linhagens de células repórteres que podem ser usadas no ensaio foram descritas, por exemplo, em Abe e cols. (1994) *Anal Biochem.* 216 (2): 276-84, incorporado nesse relatório descritivo por referência. Em algumas modalidades, cada um dos componentes do ensaio mencionados anteriormente é fornecido da mesma fonte (por exemplo, na mesma célula). Em algumas modalidades, dois dos componentes do ensaio mencionados anteriormente são fornecidos pela mesma fonte, e um terceiro componente do ensaio é fornecido por uma fonte

diferente. Em algumas modalidades, todos os três componentes do ensaio são fornecidos por fontes diferentes. Por exemplo, em algumas modalidades, a integrina e o complexo de TGF β latente (pró-TGF β e uma molécula apresentadora) são fornecidos para o ensaio pela mesma fonte (por exemplo, pela mesma linhagem de célula transfectada). Em algumas modalidades, a integrina e o TGF são fornecidos para o ensaio por fontes separadas (por exemplo, duas linhagens de células diferentes, uma combinação de integrina purificada e uma célula transfectada). Quando são usadas células como a fonte de um ou mais dos componentes do ensaio, esses componentes do ensaio podem ser endógenos à célula, expressos estavelmente na célula, transitoriamente transfectados, ou qualquer combinação destes. Os resultados de uma modalidade exemplar não limitante de um ensaio baseado em células para medição de ativação de TGF β que demonstram a inibição de complexo GARP-pró-TGF β 1 ou complexo LRRC33-pró-TGF β 1 com o uso dos anticorpos Ab1 e Ab2, revelados nesse relatório descritivo. Nesse ensaio exemplar, a IC50 (μ g/mL) de Ab1 para o complexo GARP-TGF β 1 foi de 0,445, e a IC50 (μ g/mL) de Ab1 para o complexo LRRC33-TGF β 1 foi de 1,325.

[440] Aqueles habilitados na técnica poderiam adaptar facilmente esses ensaios para várias configurações adequadas. Por exemplo, diversas fontes de TGF β podem ser consideradas. Em algumas modalidades, a fonte de TGF β é uma célula que expressa e deposita TGF β (por exemplo, uma célula primária, uma célula propagada, uma célula ou linhagem de célula imortalizada etc.). Em algumas modalidades, a fonte de TGF β é TGF β purificado e/ou recombinante imobilizado no sistema de ensaio usando meios adequados. Em algumas

modalidades, TGF β imobilizado no sistema de ensaio é apresentado dentro de uma composição de matriz extracelular (ECM) na placa de ensaio, com ou sem descelularização, que simula TGF β originado de fibroblasto. Em algumas modalidades, TGF β é apresentado na superfície celular de uma célula usada no ensaio. Adicionalmente, uma molécula apresentadora de escolha pode ser incluída no sistema de ensaio para fornecer complexo TGF β -latente adequado. Aqueles habilitados na técnica podem facilmente determinar qual molécula(s) apresentadora pode estar presente ou expressa em certas células ou tipos de células. Com o uso desses sistemas de ensaio, alterações relativas na ativação de TGF β na presença ou ausência de um agente de teste (por exemplo, um anticorpo) podem ser facilmente medidas para avaliar os efeitos do agente de teste sobre a ativação de TGF β *in vitro*. Dados de ensaios baseados em células exemplares são fornecidos na seção de Exemplos abaixo.

[441] Esses ensaios baseados em células podem ser modificados ou ajustados de diversas formas, dependendo da isoforma de TGF β que está sendo estudada, do tipo de complexo latente (por exemplo, molécula apresentadora), e semelhantes. Em algumas modalidades, uma célula que sabidamente expressa integrina capaz de ativar TGF β pode ser usada como a fonte de integrina no ensaio. Essas células incluem células SW480/ β 6 (por exemplo, clone 1E7). Em algumas modalidades, células que expressam integrina podem ser cotransfectadas com um plasmídeo que codifica uma molécula de apresentação de interesse (por exemplo, GARP, LRRC33, LTBP (por exemplo, LTBP1 ou LTBP3) etc.) e um plasmídeo que codifica uma pró-forma da isoforma de TGF β de

interesse (por exemplo, pró-TGF β 1). Após transfecção, as células são incubadas por tempo suficiente para permitir a expressão dos genes transfectados (por exemplo, cerca de 24 horas), as células são lavadas e incubadas com diluições seriais de um agente de teste (por exemplo, um anticorpo). A seguir, a linhagem de célula-repórter (por exemplo, células CAGA12) é adicionada ao sistema de ensaio, seguido por um tempo de incubação apropriado para permitir a sinalização de TGF β . Após um período de incubação (por exemplo, cerca de 18-20 horas) após a adição do agente de teste, a leitura do sinal (por exemplo, atividade de luciferase) é detectada usando meios adequados (por exemplo, para linhagens de células repórteres que expressam luciferase, o reagente Bright-Glo (Promega) pode ser usado). Em algumas modalidades, a fluorescência de Luciferase pode ser detectada com o uso de uma leitora de placas BioTek (Synergy H1), com ajustes de autoganho.

[442] Resultados representativos de ensaios de TGF β baseados em células são fornecidos na FIG. 7 nesse relatório descritivo. Dados demonstram que anticorpos da invenção exemplares que são capazes de inibir seletivamente a ativação de TGF β 1 de uma forma contexto-independente.

Ácidos nucleicos

[443] Em algumas modalidades, anticorpos, porções de ligação ao antígeno destes e/ou composições da presente revelação podem ser codificados por moléculas de ácido nucleico. Essas moléculas de ácido nucleico incluem, sem limitação, moléculas de DNA, moléculas de RNA, polinucleotídeos, oligonucleotídeos, moléculas de mRNA, vetores, plasmídeos e semelhantes. Em algumas modalidades,

a presente revelação pode compreender células programadas ou geradas para expressar moléculas de ácido nucleico que codificam compostos e/ou composições da presente revelação. Em alguns casos, os ácidos nucleicos da revelação incluem ácidos nucleicos códon-otimizados. Métodos de geração de ácidos nucleicos códon-otimizados são conhecidos na técnica e podem incluir, sem limitação, aqueles descritos nas Patentes U.S. Nºs 5.786.464 e 6.114.148, cujo conteúdo de cada um deles é incorporado nesse relatório descritivo por referência em sua totalidade.

[444] A presente invenção é ainda ilustrada pelos exemplos seguintes, que não visam ser limitantes de modo algum. O conteúdo total de todas as referências, patentes e pedidos de patente publicados citados ao longo desse pedido, bem como nas Figuras, é aqui incorporado nesse relatório descritivo por referência.

[445] Essa invenção é ainda ilustrada pelos exemplos seguintes, que não devem ser considerados como limitantes.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Inibição de TGFβ1

[446] A superfamília TGFβ inclui pró-peptídeos complexados com fatores do crescimento ativos (FIG. 1). As estratégias de seleção para obter anticorpos que estabilizam o complexo, resultando em inibição mais seletiva e potente, foram desenvolvidas.

[447] Com o uso de um sistema de expressão baseado em HEK293, afinidade em NiNTA e filtração em gel foram realizadas para obter quantidades multimiligramas de proteína purificada, que foram usadas para gerar TGFβ1 complexado à LTBP (complexo LTBP-TGFβ1) e TGFβ1 complexado

à GARP (complexo GARP-TGF β 1) (FIG. 3). A diversidade de proteínas fabricadas permitiu a testagem de reatividade cruzada entre espécies e mapeamento de epítopo.

[448] Os anticorpos candidatos foram testados com o uso de ensaios de luminescência *in vitro*. Na avaliação, anticorpos que inibiram a liberação de fator do crescimento "desligou" as células repórteres quando em contato com um estímulo para ativação normal. Foi demonstrado que Ab1 e Ab2 são inibidores da ativação de complexos de TGF β 1 latente e reagiram de forma cruzada com camundongo.

[449] Curvas iniciais de análise de dose-resposta de Ab1 em células que expressam TGF β 1 humano exibiram atividade de inibição de TGF β 1. Com o uso de uma linhagem de célula-repórter CAGA12 mais sensível, Ab1 mostrou inibição similar da atividade de pró-TGF β 1 humano. Além disso, foi demonstrado que a inibição de um complexo de GARP bloqueia a atividade supressiva de células T regulatórias (Tregs), como medido pelo percentual de células T efetoras em divisão (Teff) em células T isoladas de sangue de doador saudável. Resultados similares foram observados para Ab3. Curvas de análise de dose-resposta de Ab3 em células estreladas hepática humanas e fibroblastos de pele humana mostraram atividade de inibição de TGF β 1 (FIG. 7F) e Ab3 também demonstrou que inibe a atividade supressiva de Treg (FIG. 9B).

[450] A afinidade de inibidores de GARP-pró-TGF β 1 foi medida pelo ensaio Octet em células GARP-pró-TGF β 1 humano, enquanto a atividade foi medida por células repórteres CAGA12 que testam inibição de GARP-pró-TGF β 1 humano. O protocolo usado para mediar a afinidade dos anticorpos Ab1 e Ab2 aos complexos fornecidos nesse relatório descritivo está

resumido na Tabela 6. Os resultados são mostrados na Tabela 7.

Tabela 6: Protocolo para a realização do ensaio de ligação Octet.

Materiais:
<ul style="list-style-type: none"> - Placas de polipropileno pretas de 96 poços - Pontas para Octet revestidas com estreptavidina - 10x tampão cinético (diluído 1:10 em PBS)
1. Embeber quantidade necessária de pontas de estreptavidina em 1X tampão cinético; colocar na máquina para equilibrar
2. Carregar a placa de amostra: <ul style="list-style-type: none"> - 200 µL de tampão ou diluição de anticorpo a cada poço <ul style="list-style-type: none"> a. Coluna 1 - nível de base (tampão) b. Coluna 2 - proteína biotinizada (por exemplo, sGARP-pró-TGFβ1 ou LTBP1-pró-TGFβ1); diluída até 5 µg/mL c. Coluna 3 - nível de base 2 (tampão) d. Coluna 4 - associação de anticorpo para Ab1 e. Coluna 5 - associação de anticorpo para Ab2 f. Coluna 6 - dissociação Ab1 (tampão) g. Coluna 7 - dissociação Ab2 (tampão)
3. Fazer diluições na placa de 96 poços: <ul style="list-style-type: none"> a. Diluir ambos os anticorpos até 50 µg/mL em 300 µL de 1x tampão na fileira A. b. Adicionar 200 µL de tampão ao resto de cada coluna c. Transferir 100 µL da coluna para fazer diluições de 3 vezes
4. Colocar a placa de amostra na máquina perto da placa das pontas
5. Configurar o software <ul style="list-style-type: none"> a. Indicar tampão, carga, amostra (um ensaio por anticorpo testado) b. Indicar etapas do protocolo (nível de base, carga, associação, dissociação) para ajustar as quantidades de tempo: <ul style="list-style-type: none"> - Nível de base: 60 segundos - Carregamento: 300 segundos - Nível de base 2: 60 segundos - Associação: 300 segundos - Dissociação: 600 segundos
6. Analisar os dados

- a. Subtrair o nível de base do poço de referência
- b. Configurar a normalização para durar cinco segundos do nível de base
- c. Alinhar para dissociação
- d. Analisar a associação e dissociação (modelo de ligação 1:1, curvas de ajuste)
- e. Determinar os melhores valores R^2 ; incluir concentrações com os melhores valores R^2
- f. Selecionar ajuste global
- g. Configurar cores de amostras por tipo de sensor
- h. Analisar
- i. Salvar e exportar a tabela

Tabela 7: Afinidade e atividade de inibidores de GARP-pró-TGF β 1.

Clone	Afinidade para GARP-pró-TGF β 1 (nM \pm SEM)	Inibição (IC50) de GARP-pró-TGF β 1 (nM; IC de 95%)	Efeito máximo (% de inibição)
Ab1	0,046 \pm 0,043	3,4 (2,1-5,4)	75%
Ab2	0,561 \pm 0,014	3,9 (1,5-10,3)	50%

[451] Os clones foram ainda avaliados quanto à seletividade de ligação (Tabela 8) e reatividade cruzada entre espécies (Tabela 9). Ab1 e Ab2 não se ligaram ao TGF β 1, TGF β 2 ou TGF β 3, mas se ligaram aos complexos de pró-TGF β 1 e mostraram reatividade cruzada entre espécies.

Tabela 8: Seletividade de inibidores de GARP-pró-TGF β 1.

Clone	GARP-pró-TGF β 1	LTBP1-pró-TGF β 1	LTBP3-pró-TGF β 1
Ab1	+++	+++	+++
Ab2	+++	+++	+++

Tabela 9: Reatividade cruzada entre espécie de inibidores de GARP-pró-TGF β 1.

Clone	huGARP-pró-TGF β 1	muGARP-pró-TGF β 1	cyGARP-pró-TGF β 1
Ab1	+++	++	+++
Ab2	+++	+++	+++

+++ $K_D < 1$ nM

++ $K_D 1 - 10$ nM

+ $K_D 10 - 100$ nM

- Sem ligação

[452] A especificidade de ligação para Ab3 foi ainda testada pelo ensaio de ligação Octet. Como demonstrado na FIG. 4A, Ab3 se ligou especificamente ao TGF β 1 latente, mas não ao TGF β 2 latente ou TGF β 3 latente, enquanto pan-anticorpos de TGF-beta não são isoforma-específicos (FIG. 5). Esses dados demonstram que Ab3 se liga ao TGF β de um modo isoforma-específico.

Exemplo 2: Ab1, Ab2 e Ab3 se ligam especificamente aos complexos de pró-TGF β 1 de várias espécies.

[453] Para determinar se Ab1, Ab2 e Ab3 são capazes de se ligar especificamente a complexos de pró-TGF β 1 de várias espécies, foram realizados ensaios de ligação Octet como descrito na Tabela 6. Como mostrado na Tabela 10 (abaixo), todos os 3 anticorpos (ou seja, Ab1, Ab2 e Ab3) se ligaram especificamente aos complexos LTBP1-pró-TGF β 1 humanos e murídeos, complexos LTBP3-pró-TGF β 1 humanos e complexos GARP-pró-TGF β 1 humanos. No entanto, somente Ab2 e Ab3 se ligaram especificamente aos complexos LTBP1-pró-TGF β 1 de rato.

Tabela 10. Afinidade de Ab1, Ab2 e Ab3 por complexos de pró-TGF β 1 de várias espécies.

	Ab1 (K _D)	Ab2 (K _D)	Ab3 (K _D)
LTBP1-pró-TGF β 1 humano	16 \pm 1,3	5,8 \pm 0,6	1,1 \pm 0,07
LTBP3-pró-TGF β 1 humano	85 \pm 5,0	122 \pm 3,9	0,12 \pm 0,04
LTBP1-pró-TGF β 1 de camundongo	203 \pm 13	61 \pm 4,0	0,68 \pm 0,06
LTBP1-pró-TGF β 1 de rato	Nenhuma ligação detectada	38 \pm 6,8	0,93 \pm 0,03
GARP-pró-TGF β 1 humano	293 \pm 22	58 \pm 6,2	4,9 \pm 0,11

Exemplo 3: Ab2 e Ab3 se ligam a LRRC33-pró-TGF β 1

[454] Para determinar se Ab1, Ab2 e Ab3 se ligam ao pró-TGF β 1 que está complexado com LRRC33, foram realizados ensaios de ligação Octet. Como mostrado na FIG. 12C, Ab1, Ab2 e Ab3 são capazes de se ligar ao complexo LRRC33-pró-TGF β 1 de proteína. No entanto, Ab1 mostra uma taxa lenta para ligação ao complexo de proteína LRRC33-pró-TGF β 1. A ligação de Ab1, Ab2 e Ab3 ao complexo de proteína LRRC33-pró-TGF β 1 foi ainda confirmada com o uso de ELISA.

Exemplo 4: Ab1, Ab2 e Ab3 inibem a atividade tanto de GARP-pró-TGF β 1 quanto de LRRC33-pró-TGF β 1

[455] Para determinar se Ab1, Ab2 e Ab3 inibem a atividade de GARP-pró-TGF-P1 e/ou LRRC33-pró-TGF β 1, foi realizado um ensaio baseado em células *in vitro*. Nesse sistema de ensaio, uma linhagem de células de câncer do cólon humano modificada geneticamente (células SW480/ β 6) transfectada estavelmente com integrina β 6 foi cotransfectada com uma construção para expressar pró-TGF-P1 e uma construção para expressar uma molécula apresentadora (ou seja, GARP ou LRRC33). Para expressar as moléculas apresentadoras, construções que codificam LRRC33-GARP quimérico (ID. DE SEQ. N°: 101) ou GARP foram empregadas. As células transfectadas foram incubadas para permitir expressão e depósito suficientes dos componentes (integrinas e pró-TGF β 1 complexado com uma respectiva molécula de apresentadora). A ativação de TGF β 1 na presença ou ausência de Ab1 ou Ab2 ou Ab3 foi testada com o uso de células repórteres (células CAGA12) que expressam receptores de TGF β acoplados à sua via transdução de sinal a jusante, para mediar a atividade inibidora do anticorpo. Como mostrado nas FIGS. 7A e 7B, Ab1, Ab2 e Ab3 inibiram tanto GARP-pró-TGF-

$\beta 1$ quanto LRRC33-pró-TGF- $\beta 1$.

[456] Um ensaio baseado em células adicional foi realizado para detectar a inibição do complexo GARP-pró-TGF $\beta 1$ ou do complexo LRRC33-pró-TGF $\beta 1$ usando os anticorpos Ab1 e Ab2. Ab1 e Ab2 inibiram tanto GARP-pró-TGF- $\beta 1$ quanto LRRC33-pró-TGF- $\beta 1$. Nesse ensaio, a IC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) de Ab1 para o complexo GARP-TGF $\beta 1$ foi de 0,445, e a IC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) de Ab1 para o complexo LRRC33-TGF $\beta 1$ foi de 1,325.

Exemplo 5: Ensaios para detecção de uma ativação LTBP-TGF $\beta 1$ -específica

[457] Em algumas modalidades, métodos e composições fornecidas neste relatório descritivo estão relacionados a um método para detecção de um complexo LTBP-TGF $\beta 1$, por exemplo, um complexo LTBP1- ou LTBP3-TGF $\beta 1$, em uma amostra.

A. Ativação de TGF $\beta 1$ latente depositado na ECM

[458] Nesse ensaio, moléculas apresentadoras são cotransfectadas com pró-TGF $\beta 1$ em células que expressam integrina. Células transfectadas transitoriamente são semeadas em placas de ensaio na presença de inibidores. Complexo LTBP-pró-TGF $\beta 1$ latente é embebido na ECM. Células-repórter de TGF β são então adicionadas ao sistema; fator de crescimento livre (liberado por integrina) sinaliza e é detectado por ensaio de luciferase.

[459] O protocolo seguinte é um exemplo para medição da ativação da matriz extracelular (apresentada por LTBP) por células de integrina. Materiais incluem: células MvLu1-CAGA12 (Clone 4A4); células SW480/ $\beta 6$ (Clone 1E7) (subunidade αV é expressa endogenamente em níveis elevados; subunidade $\beta 6$ está estavelmente superexpressa); linhagem de células LN229 (níveis elevados de integrina $\alpha V\beta 8$ endógena); placa de

ensaio de 96 poços tratada com TC de parede branca Costar #3903; placa de ensaio de 96 poços branca clara Greiner Bio-One High Binding #655094; Fibronectina Humana (Corning #354008); pipeta multicanais P200; pipetas P20, P200 e P1000 com pontas de filtro estéreis para cada; tubos e estante de microcentrífuga estéreis; reservatórios de reagentes estéreis; azul tripano 0,4%; pipetas estéreis de 2 ml, 5 ml, 10 ml e 25 ml; placas de cultura de tecido tratadas de 100 mm ou 150 mm; etanol 70%; meios de soro reduzido Opti-MEM (Life Tech #31985-070); Lipofectamina 3000 (Life Tech #L3000015); reagente de ensaio de luciferase Bright-Glo (Promega #E2620); Tripsina 0,25% + 0,53 mM de EDTA; plasmídeo de expressão pró-TGF β 1, humano (SR005); plasmídeo de expressão de LTBP1S, humano (SR044); plasmídeo de expressão de LTBP3, humano (SR117); plasmídeo de expressão de LRRC32 (GARP), humano (SR116); e plasmídeo de expressão de LRRC33, humano (SR386). O equipamento utilizado inclui: leitora de placas BioTek Synergy H1; coifa TC; centrífuga de bancada superior; incubadora de CO₂ a 37°C CO₂ 5%; banho-maria/de glóbulos a 37°C; agitadora de plataforma; microscópio; e hemocitômetro/contador.

[460] "Células CAGA12 4A4" são um derivado de células MvLu1 (células epiteliais de pulmão de marta), transfectadas estavelmente com promotor sintético de CAGA12, que dirige a expressão do gene de luciferase. "DMEM-BSA 0,1%" é um meio de ensaio; o meio de base é DMEM (Nº de Catálogo Gibco 11995-065), os meios também contêm BSA diluído até 0,1% p/v, penicilina/estreptomicina, e 4 mM de glutamina. "D10" se refere a DMEM-FBS 10%, P/S, 4 mM de glutamina, NEAA 1%, 1X GlutaMAX (Nº de Catálogo Gibco 35050061). "Meio SW480/ β 6" se

refere a D10 + 1000 µg/mL de G-418. "Meio CAGA12 (4A4)" se refere a D10 + 0,75 µg/mL de puromicina.

[461] No Dia 0, as células são semeadas para transfecção. Células SW480/β6 (clone 1E7) são destacadas com tripsina e peletizadas (centrifugar 5 min @ 200 x g). O pélete de células é ressuspenso em meio D10 e células viáveis por ml são contadas. As células são semeadas a 5,0e6 células/12 ml/placa de TC de 100 mm. Para células CAGA12, as células são passadas em uma densidade de 1,0 milhão por frasco T75, para serem usadas para o ensaio no Dia 3. As culturas são incubadas a 37°C e CO₂ 5%.

[462] No Dia 1, células que expressam integrina são transfectadas. É seguido o protocolo do fabricante para transfecção com reagente Lipofectamina 3000. Resumidamente, os seguintes são diluídos em OptiMEM I, por 125 µL por poço: 7,5 µg de DNA (molécula apresentadora) + 7,5 µg de DNA (pró-TGFβ1), 30 µL de P3000, e até 125 µL com OptiMEM I. O poço é misturado por pipetagem de DNA juntos, e depois OptiMEM é adicionado. P3000 é adicionado, e tudo é bem misturado por pipetagem. Uma mistura principal de Lipofectamina 3000 é feita, para ser adicionada às misturas de DNA: para o ensaio de LTBP1: 15 µL de Lipofectamina 3000, até 125 µL em OptiMEM I, por poço; para o ensaio de LTBP3: 45 µL de Lipofectamina 3000, até 125 µL em OptiMEM I, por poço. Lipofectamina 3000 diluída é adicionada ao DNA, bem misturada por pipetagem, e incubada em temperatura ambiente por 15 min. Após a incubação, a solução é misturada algumas vezes por pipetagem, e depois 250 µL de DNA:Lipofectamina 3000 (2 x 125 µL) por placa são adicionados gota-a-gota. Cada placa é gentilmente agitada para misturar e a placa é retornada à incubadora de

cultura de tecido por aproximadamente 24 horas.

[463] Quantidades equivalentes de cada plasmídeo são tipicamente ótimas para cotransfecção. No entanto, a cotransfecção pode ser otimizada por alteração da proporção de DNA de plasmídeos para molécula apresentadora e pró-TGF β 1.

[464] Nos Dias 1-2, as placas de ensaio são revestidas com fibronectina humana. Especificamente, fibronectina liofilizada é diluída até 1 mg/mL em água destilada ultrapura (estéril). 1 mg/mL de solução de estoque é diluído até 19,2 μ g/mL em PBS (estéril). Cinquenta μ L/poço são adicionados à placa de ensaio (ligação elevada) e incubados de um dia para o outro em incubadora de cultura de tecido (37°C e CO₂ 5%). A concentração final é de 3,0 μ g/cm².

[465] No Dia 2, as células transfectadas são plaqueadas para ensaio e adição de inibidor. Primeiro, o revestimento de fibronectina é lavado por adição de 200 μ L/poço de PBS à solução de fibronectina já na placa de ensaio. A lavagem é removida manualmente com uma pipeta multicanais. A lavagem é repetida para um total de duas lavagens. Permite-se que a placa seque em temperatura ambiente sem tampa antes da adição de células. As células são então plaqueadas por descolamento com tripsina e peletizadas (centrifugar 5 min @ 200 x g). O pélete é ressuspenso em meio de ensaio e as células viáveis contadas por ml. Para o ensaio de LTBP1, as células são diluídas até 0,10e6 células/mL e semeadas a 50 μ L por poço (5.000 células por poço). Para o ensaio de LTBP3, as células são diluídas até 0,05e6 células/mL e semeadas a 50 μ L por poço (2.500 células por poço). Para preparar diluições funcionais de anticorpo, os anticorpos são pré-diluídos até uma concentração de trabalho consistente em veículo. Os

anticorpos de estoque são diluídos serialmente em veículo (PBS é ótimo, evitar tampão de citrato de sódio). Cada ponto de diluição serial é diluído em meio de ensaio para uma concentração final 4X de anticorpo. Vinte e cinco μL por poço de 4X anticorpo são adicionados e as culturas são incubadas a 37°C e CO_2 5% por aproximadamente 24 horas.

[466] No Dia 3, as células repórteres de $\text{TGF}\beta$ são adicionadas. As células CAGA12 (clone 4A4) para o ensaio são destacadas com tripsina e peletizadas (centrifugar 5 min @ $200 \times g$). O pélete é ressuspensionado em meio de ensaio e células viáveis por mL são contadas. As células são diluídas até $0,4 \times 10^6$ células/mL e semeadas a 50 μL por poço (20.000 células por poço). As células são retornadas à incubadora.

[467] No Dia 4, o ensaio é lido (16–20 horas após adição de anticorpo e/ou célula repórter). É permitido que o reagente Bright-Glo e a placa de destê cheguem até a temperatura ambiente antes da leitura. Os ajustes de leitura em BioTek Synergy H1 são feitos usando o protocolo TMLC_std – esse método possui a configuração de autoganho. Poços positivos de controle são selecionados para autoescala (elevada). Cem μL de reagente Bright-Glo são adicionados por poço. Incubar por 2 min com agitação, em temperatura ambiente; proteger a placa da luz. A placa é lida em BioTek Synergy H1.

[468] Dados gerados por esse ensaio refletem atividade de ligação LTBP1- $\text{TGF}\beta 1$ e/ou LTBP3- $\text{TGF}\beta 1$ em sobrenadantes de células.

B. Ativação de $\text{TGF}\beta 1$ latente apresentado na superfície da célula

[469] Para detectar a ativação de $\text{TGF}\beta 1$ latente presente

na superfície da célula, moléculas apresentadoras são cotransfectadas com pró-TGF β 1 em células que expressam integrina. TGF β 1 latente é expresso na superfície da célula por GARP ou LRRC33. Células repórteres de TGF β e inibidores são então adicionados ao sistema; fator de crescimento livre (liberado por integrina) sinaliza e é detectado por ensaio de luciferase. Esse ensaio, ou protocolo de "transfecção direta", é ótimo para ativação de TGF β 1 apresentado na superfície da célula (apresentador de GARP ou LRRC33) por células de integrina.

[470] Os materiais usados incluíram: células MvLu1-CAGA12 (Clone 4A4); células SW480/ β 6 (Clone 1E7) (subunidade α V é expressa endogenamente em níveis elevados; subunidade β 6 está estavelmente superexpressa); linhagem de células LN229 (níveis elevados de integrina α V β 8 endógena); placa de ensaio de 96 poços tratada com TC de parede branca Costar #3903; placa de ensaio de 96 poços branca clara Greiner Bio-One High Binding #655094; Fibronectina Humana (Corning #354008); pipeta multicanais P200; pipetas P20, P200 e P1000 com pontas de filtro estéreis para cada; tubos e estante de microcentrífuga estéreis; reservatórios de reagentes estéreis; azul tripano 0,4%; pipetas estéreis de 2 mL, 5 mL, 10 mL e 25 mL; placas de cultura de tecido tratadas de 100 mm ou 150 mm; etanol 70%; meios de soro reduzido Opti-MEM (Life Tech #31985-070); Lipofectamina 3000 (Life Tech #L3000015); reagente de ensaio de luciferase Bright-Glo (Promega #E2620); Tripsina 0,25% + 0,53 mM de EDTA; plasmídeo de expressão pró-TGF β 1, humano (SR005); plasmídeo de expressão de LTBP1S, humano (SR044); plasmídeo de expressão de LTBP3, humano (SR117); plasmídeo de expressão de LRRC32

(GARP), humano (SR116); e plasmídeo de expressão de LRRC33, humano (SR386).

[471] O equipamento usado inclui: leitora de placas BioTek Synergy H1; coifa TC; centrífuga de bancada superior; incubadora de CO₂ a 37°C CO₂ 5%; banho-maria/de glóbulos a 37°C; agitadora de plataforma; microscópio; hemocitômetro/contador.

[472] O termo "células CAGA12 4A4" se refere a um derivado de células MvLu1 (células epiteliais de pulmão de marta), transfectadas estavelmente com promotor sintético de CAGA12, que dirige a expressão do gene de luciferase. "DMEM-BSA 0,1%" se refere a um meio de ensaio; o meio de base é DMEM (Nº de Catálogo Gibco 11995-065), os meios também contêm BSA diluído até 0,1% p/v, penicilina/estreptomicina, e 4 mM de glutamina. "D10" se refere a DMEM-FBS 10%, P/S, 4 mM de glutamina, NEAA 1%, 1X GlutaMAX (Nº de Catálogo Gibco 35050061). "Meio SW480/β6" se refere a D10 + 1000 µg/mL de G-418. "Meio CAGA12 (4A4)" se refere a D10 + 0,75 µ/mL de puromicina.

[473] No Dia 0, células que expressam integrina são semeadas para transfecção. As células são destacadas com tripsina e peletizadas (centrifugar 5 min @ 200 x g). O pélete de células é ressuspenso em meio D10 e células viáveis por ml são contadas. As células são diluídas até 0,1e⁶ células/mL e semeadas a 100 µL por poço (10.000 células por poço) em uma placa de ensaio. Para células CAGA12, é feita passagem em uma densidade de 1,5 milhão para T75 frasco, para serem usadas para o ensaio no Dia 2. As culturas são incubadas a 37°C e CO₂ 5%.

[474] No Dia 1, as células são transfectadas. É seguido

o protocolo do fabricante para transfecção com reagente Lipofectamina 3000. Resumidamente, os seguintes são diluídos em OptiMEM I, para 5 µL por poço: 0,1 µg de DNA (molécula apresentadora) + 0,1 µg de DNA (pró-TGFβ1), 0,4 µL de P3000, e até 5 µL com OptiMEM I. O poço é misturado por pipetagem de DNA juntos, e depois OptiMEM é adicionado. P3000 é adicionado, e tudo é bem misturado por pipetagem. Uma mistura principal é feita com Lipofectamina 3000, para ser adicionada às misturas de DNA: 0,2 µL de Lipofectamina 3000, até 5 µL em OptiMEM I, por poço. Lipofectamina 3000 diluída é adicionada ao DNA, bem misturada por pipetagem, e incubada em temperatura ambiente por 15 min. Após a incubação, a solução é misturada algumas vezes por pipetagem, e depois 10 µL por poço de DNA:Lipofectamina 3000 (2 x 5 µL) são adicionados. A placa de células é retornada à incubadora de cultura de tecido por aproximadamente 24 horas.

[475] No Dia 2, o anticorpo e células repórteres de TGFβ são adicionados. A fim de preparar diluições funcionais de anticorpo, anticorpo de estoque em veículo (PBS é ótimo) é diluído serialmente. A seguir, cada ponto é diluído em meio de ensaio por 2X a concentração final de anticorpo. Após preparação dos anticorpos, a placa de células é lavada duas vezes com meios de ensaio, por aspiração (aspirador a vácuo), seguido pela adição de 100 µL por poço de meios de ensaio. Após a segunda lavagem, o meio de ensaio é substituído com 50 µL por poço de anticorpo 2X. A placa de células é retornada à incubadora por aproximadamente 15-20 min.

[476] A fim de preparar as células CAGA12 (clone 4A4) para o ensaio, as células são destacadas com tripsina e peletizadas (centrifugar 5 min @ 200 x g). O pélete é

ressuspenso em meio de ensaio e células viáveis por ml são contadas. As células são diluídas até $0,3 \times 10^6$ células/mL e semeadas a 50 μ L por poço (15.000 células por poço). As células são retornadas à incubadora.

[477] No Dia 3, o ensaio é lido cerca de 16-20 horas após a adição de anticorpo e/ou célula repórter. É permitido que o reagente Bright-Glo e a placa de deste cheguem até a temperatura ambiente antes da leitura. Os ajustes da leitura em BioTek Synergy H1 são feitos para usar o protocolo TMLC_std - esse método possui a configuração de autoganho. Poços de controle positivos são configurados para autoescala (alto). 100 μ L de reagente Bright-Glo são adicionados por poço. Incubar por 2 min com agitação, em temperatura ambiente; proteger a placa da luz. A placa é lida em BioTek Synergy H1.

[478] Dados gerados por esse ensaio refletem a atividade de TGF β 1 em sobrenadantes de células. As unidades de dados brutas são relativas às unidades de luz (RLU). Amostras com valores de RLU elevados contêm quantidades elevadas de TGF β 1 livre; amostras com valores baixos de RLU contêm níveis baixos de TGF β 1.

Exemplo 6: Ab1 e Ab2 inibem TGF β 1 endógeno em fibroblastos humanos e murídeos

[479] Para determinar se Ab1 e Ab2 eram capazes de inibir TGF β 1 endógeno secretado por fibroblastos primários cultivados de origens diferentes, foi realizado um ensaio quantitativo *in vitro* no qual a atividade de TGF β 1 secretado foi determinada por medição dos níveis de luciferase produzidos por células epiteliais pulmonares de marta que foram transfectadas estavelmente com um ácido nucleico que

compreende um gene-repórter de luciferase fundido a um promotor sintético de CAGA12, e cocultivados com fibroblastos tratados com Ab1 ou Ab2. Como mostrado nas FIGS. 7G e 7H, tanto Ab1 quanto Ab2 inibiram TGF β 1 endógeno secretado por fibroblastos dérmicos humanos normais, fibroblastos pulmonares murídeos C57BL.6J, e fibroblastos musculares DBA2/J. Diferenças na inibição máxima observada com cada anticorpo eram linhagem de célula-específicas.

Exemplo 7: Papel da rigidez da matriz e efeitos de anticorpos TGF β 1-específicos, contexto-independentes, sobre a ativação de TGF β 1 induzida por integrina *in vitro*

[480] Para examinar se substratos com diferentes graus de rigidez podem modular a ativação de TGF β 1, substratos baseados em silício de rigidez controlada (5 kPa, 15 kPa e 100 kPa) foram usados para medir a ativação de TGF β 1 integrina-dependente em fibroblastos primários neles plaqueados. Resumidamente, células SW480 foram cotransfectadas com pró-TGF β 1 e LTBP1 para permitir a apresentação extracelular do complexo de TGF β 1 latente. Células que superexpressam integrina α v β 6 foram adicionadas ao sistema de ensaio para desencadear a ativação de TGF β 1. A ativação de TGF β 1 foi determinada por medição da ativação do gene-repórter responsiva ao TGF β . Nesse quadro, integrina α v β 6 causou um aumento de aproximadamente duas vezes na ativação de TGF β 1 mediada por LTBP1 em células plaqueadas nos substratos de silício de rigidez elevada (100 kPa) testados, comparadas com células cultivadas em substratos de silício com rigidez menor (5 ou 15 kPa), sob condições de outro modo idênticas. Os presentes inventores verificaram que inibidores isoforma-específicos, contexto-permissivos,

da ativação de TGF β 1, tais como aqueles descritos nesse relatório descritivo, podem suprimir esse efeito, reduzindo a ativação de TGF β 1 até aproximadamente metade do nível, comparado com controle sem anticorpo em todos os graus de rigidez testados.

Exemplo 8: Efeitos de anticorpos TGF β 1-específicos, contexto-independentes, sobre a ativação de TGF β 1 induzida por protease *in vitro*

[481] Para testar a ativação de TGF β 1 protease-dependente, integrina-independente, *in vitro*, complexo LTBP3-pró-TGF β 1 purificado recombinante foi incubado com Calicreína (KLK), e a ativação de TGF β 1 foi medida usando um sistema de célula repórter como descrito. TGF β 1 foi liberado pelo complexo latente após incubação com KLK, mas não com veículo isoladamente, sugerindo que a atividade de TGF β 1 associado à ECM pode ser desencadeada de uma forma protease-dependente.

[482] Para testar ainda mais a habilidade de um anticorpo inibidor isoforma-específico, contexto-independente, para inibir um modo alternativo (por exemplo, integrina-independente) de ativação de TGF β 1, foi estabelecido um ensaio *in vitro* para avaliar a ativação de TGF β 1 por Calicreína. Resumidamente, células repórteres CAGA foram semeadas 24 horas antes do início do ensaio. Pró-TGF β -C4S foi titulado em células CAGA. Protease plasmática KLK foi adicionada em uma concentração fixa de 1 micrograma por mL ou 500 nanogramas por mL. A mistura de ensaio foi incubada por aproximadamente 18 horas. A ativação de TGF β foi medida pelo ensaio de Luciferase. Dados são mostrados na FIG. 8. Na presença de KLK, pró-TGF β 1 foi ativado (controle positivo).

Essa ativação de TGF β foi eficazmente inibida pela adição de Ab3, indicando que, além da ativação de TGF β 1 integrina-dependente, esse anticorpo inibidor isoforma-específico, contexto-independente, também pode bloquear a ativação de TGF β 1 KLK-dependente *in vitro*. Similarmente, a inibição de TGF β 1 ativada por KLK também foi observada com adição de Ab1 (dados não mostrados).

Exemplo 9: Expressão de LRRC33 em macrófagos polarizados e ativados.

[483] Foi descrito previamente que a sinalização de TGF β está envolvida na maturação e diferenciação e eventuais fenótipos de macrófagos. Foi sugerido que macrófagos derivados de monócito expressam LRRC33. Estudos adicionais de macrófagos polarizados revelaram que nem todos os macrófagos polarizados expressam LRRC33. Verificamos que os denominados macrófagos tipo M1 clássicos exibem expressão baixa de LRRC33, enquanto macrófagos M2 mostraram expressão elevada de LRRC33. Inesperadamente, entre os subtipos de macrófagos M2, observamos expressão de LRRC33 somente em macrófagos M2c e M2d, TAM-like. O primeiro é o chamado macrófago "pró-fibrótico", e o último é o "TAM-like" ou que simula o fenótipo tumor-associado. Esses resultados mostram que a expressão de LRRC33 está restrita a um subconjunto seletivo de macrófagos polarizados.

[484] Evidências sugerem que células tumorais e/ou células tumorais do estroma circundante secretam diversas citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, que podem influenciar os fenótipos (por exemplo, ativação, diferenciação) de várias células no TME. Por exemplo, o fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF também referido

como CSF-1) é um fator derivado de tumores conhecido, que pode regular a ativação e o fenótipo de TAM.

[485] Análises de classificação de células ativada por fluorescência (FACS) foram realizadas para examinar os efeitos de uma exposição ao M-CSF sobre a expressão de LRRC33 em macrófagos. Resumidamente, PBMCs humanas foram coletadas de doadores saudáveis. As células primárias foram cultivadas por uma semana, em um meio contendo soro humano 10%, mais GM-CSF ou M-CSF. Para induzir vários fenótipos de macrófagos M2, as células foram cultivadas por mais 2-3 dias na presença de IL-10 e TGF β para o subtipo M2c, e IL-6 para o subtipo M2d. Anticorpos contra os marcadores da superfície da célula, como indicado na figura, foram usados nas análises FACS. A seleção imunomagnética CD14⁺ indica monócitos.

[486] Surpreendentemente, os resultados mostraram que a supra-regulação de LRRC33 da superfície da célula em macrófagos era significativamente aumentada mediante exposição ao M-CSF (também conhecido como CSF-1). A FIG. 10A mostra que o fenótipo dos macrófagos tratados com M-CSF é uniformemente aquele de macrófagos M2 polarizados. Além disso, a exposição ao M-CSF faz com que os macrófagos expressem uniformemente LRRC33 na superfície da célula (veja a FIG. 10B). Como resumido na FIG. 10C, foi observada expressão robusta de LRRC33 em macrófagos ativados por M-CSF. Esses resultados sugerem que fatores derivados de tumores como, por exemplo, M-CSF, podem induzir ativação local de macrófagos para dar suporte ao crescimento tumoral.

Exemplo 10: Efeito de Ab3 sobre a atividade de células T reguladoras (Treg) *in vivo*

[487] Foi demonstrado que GARP é expresso em células T

regulatórias. O efeito de Ab3 sobre a atividade de células T regulatórias *in vivo* foi avaliado usando um modelo de colite por transferência de célula T (Powrie e cols., 1993 *International Immunology*, 5 (11): 1.464-1.474; Powrie e cols., 1994 *Immunity*, 1: 553-562; Powrie e cols., 1996 *J. Exp. Med.*, 186: 2.669-2.674). A transferência de células T CD45Rb^{hi} em camundongos com deficiência imune combinada (SCID) severa sabidamente induz colite, e a co-transferência de células T regulatórias (Treg) CD45Rb^{lo} CD25⁺ inibe o desenvolvimento de colite e exibe efeito protetor sobre os camundongos. Como demonstrado na FIG. 11, camundongos que recebem 30 mg/kg de Ab3 eliminaram o efeito protetor demonstrado por co-transferência de Treg CD45Rb^{lo} CD25⁺. Especificamente, camundongos que recebem 30 mg/kg de Ab3 demonstraram um aumento significativo na pontuação de inflamação do cólon proximal e da proporção do peso para comprimento do cólon, e uma redução significativa no ganho de peso corporal, comparado com controle de IgG. Esses dados demonstram que Ab3 é capaz de suprimir a atividade de células T regulatórias *in vivo*.

Exemplo 11: Efeitos de Ab1 e Ab2 isoladamente ou em combinação com anticorpo anti-PD-1 sobre a progressão tumoral no modelo em camundongos singênicos de carcinoma do cólon murídeo MC38

[488] Para avaliar os efeitos de Ab1 e Ab2, isoladamente ou em combinação com um anticorpo anti-PD-1 para diminuir a progressão do tumor de carcinoma de cólon, foi usado o modelo em camundongo singênico C57BL/6 de carcinoma de cólon murídeo MC38.

Cultura de célula tumoral

[489] Células de carcinoma de cólon murídeo MC38 foram desenvolvidas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) contendo soro bovino fetal 10%, 100 unidades/mL de penicilina G sódica, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, 25 µg/mL de gentamicina e 2 mM de glutamina. As culturas de células foram mantidas em frascos de cultura de tecido em uma incubadora umidificada a 37°C, em uma atmosfera de CO₂ 5% e ar 95%.

Implantação e crescimento tumoral *in vivo*

[490] As células MC38 usadas para implantação foram coletadas durante crescimento em fase log e ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato (PBS). No dia do implante do tumor, cada camundongo de teste foi injetado por via subcutânea no flanco direito com 5 x 10⁵ células (suspensão de células de 0,1 mL), e o crescimento tumoral foi monitorado como o tamanho médio que se aproximava da faixa-alvo de 80 a 120 mm³. Onze dias mais tarde, designado como Dia 1 do estudo, os camundongos foram separados em grupos de acordo com o tamanho do tumor calculado, cada um consistindo em doze animais com volumes tumorais individuais variando de 63 a 196 mm³ e volumes tumorais médios do grupo de 95 a 98 mm³. Os tumores foram medidos em duas dimensões com o uso de compassos de calibre, e o volume foi calculado usando a fórmula:

$$\text{Volume tumoral (mm}^3\text{)} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

em que w = largura e l = comprimento, em mm, do tumor. O peso do tumor pode ser estimado presumindo que 1 mg é equivalente a 1 mm³ de volume tumoral.

Tratamento

[491] Resumidamente, fêmeas de camundongos C57BL/6 (n = 12) com oito semanas de idade que abrigam tumores MC38 subcutâneos (63-172 mm³) no Dia 1 receberam a administração por via intraperitoneal (i.p.) duas vezes por semana por quatro semanas de Ab1, Ab2, anticorpo de controle IgG1 murídeo (cada um a 30 mg/kg em um volume de dosagem de 10 ml/kg). Quando os tumores alcançaram 150 mm³ (Dia 6) nos grupos de controle, os camundongos receberam a administração de anticorpo de rato anti-PD-1 de camundongo (RMP1-14) ou anticorpo de controle IgG₂A de rato i.p. duas vezes por semana por duas semanas (cada anticorpo a 5 mg/kg em um volume de dosagem de 10 mL/kg).

[492] O Grupo 1 serviu como controles de crescimento tumoral, e recebeu anticorpo de controle de isótipo de IgG1 murídeo em combinação com anticorpo de controle de IgG_{2a} de rato. O Grupo 2 recebeu Ab1 em combinação com anticorpo de controle de IgG_{2a} de rato. O Grupo 3 recebeu Ab2 em combinação com anticorpo de controle de IgG_{2a} de rato. O Grupo 3 recebeu anticorpo de controle IgG1 murídeo em combinação com anticorpo anti-PD-1. O Grupo 4 recebeu Ab1 em combinação com anticorpo anti-PD-1. O Grupo 5 recebeu Ab2 em combinação com anticorpo anti-PD-1. O Grupo 6 (n = 16) não foi tratado e serviu como um grupo de controle da amostragem.

Análise de ponto final e de retardo do crescimento tumoral (TGD)

[493] Os tumores foram medidos usando compassos de calibre duas vezes por semana, e cada animal era sacrificado quando seu tumor alcançava o volume do ponto final de 1.000 mm³ ou ao final do estudo (Dia 60), o que acontecesse primeiro. Os camundongos que saíram do estudo pelo ponto

final do volume tumoral foram documentados como sacrificados por progressão do tumor (TP), com a data do sacrifício. O tempo até o ponto final (TTE) para análise foi calculado para cada camundongo de acordo com os métodos descritos no Pedido U.S. Provisório N° 62/558.311, depositado em 13 de setembro de 2017.

MTV e critérios para respostas de regressão

[494] A eficácia do tratamento pode ser determinada pelos volumes tumorais de animais que permanecem no estudo no último dia. O MTV (n) foi definido como o volume tumoral mediano no último dia do estudo no número de animais restantes (n) cujos tumores não alcançaram o volume do ponto final.

[495] A eficácia do tratamento também pode ser determinada a partir da incidência e magnitude de respostas de regressão observadas durante o estudo. O tratamento pode causar regressão parcial (PR) ou regressão completa (CR) do tumor em um animal. Em uma resposta PR, o volume tumoral era 50% ou menor do que seu volume no Dia 1 por três medições consecutivas durante a evolução do estudo, e igual ou maior do que 13,5 mm³ para uma ou mais dessas três medições. Em uma resposta CR, o volume tumoral foi menor do que 13,5 mm³ por três medições consecutivas durante a evolução do estudo. Um animal com uma resposta CR no término de um estudo foi adicionalmente classificado como um sobrevivente livre de tumor (TFS). Os animais foram monitorados quanto as respostas de regressão.

Inibição do crescimento tumoral

[496] A análise da inibição do crescimento tumoral (TGI) avalia a diferença nos volumes tumorais medianos (MTVs) de

camundongos tratados e de controle. Para esse estudo, o ponto final para determinação da TGI foi o Dia 29, que foi o dia em que os camundongos de controle alcançaram o volume tumoral médio de 1.500 mm³. O MTV (n), o volume tumoral mediano para o número de animais, n, no dia da análise da TGI, foi determinado para cada grupo. O percentual da inibição do crescimento tumoral (%TGI) foi definido como a diferença entre o MTV do grupo de controle designado e o MTV do grupo tratado com fármaco, expresso como uma porcentagem do MTV do grupo de controle.

[497] O conjunto de dados para a análise da TGI incluiu todos os camundongos em um grupo, exceto aqueles que morreram em decorrência de causas relacionadas ao tratamento (TR) ou não relacionadas ao tratamento (NTR) antes do dia da análise da TGI.

[498] No presente estudo, Ab1 e Ab2 foram avaliados isoladamente e em combinação com anti-PD-1 no modelo em camundongo singênico C57BL/6 de carcinoma de cólon murídeo MC38. Camundongos que receberam a administração de Ab2 em combinação com anti-PD-1 resultaram em TGI significativa no Dia 29 ($P < 0,05$, teste U de Mann-Whitney), produzindo benefício de sobrevida que era estatisticamente significativamente diferente de controles tratados com veículo usando análises de sobrevida *Log-rank* ($P < 0,05$, *Log-rank*) (veja a FIG. 16). Camundongos que recebem Ab1 ou Ab2 em combinação com anticorpo de controle de IgG_{2a} de rato tiveram respostas de regressão de 1 CR e 1 PR, respectivamente. Em combinação com anti-PD-1, as respostas de regressões de Ab1 e Ab2 foram de 1 PR e 1 CR, e 4 CRs, respectivamente. Ab2 em combinação com anti-PD-1 produziu

eficácia de curto prazo significativa no Dia 29 e produziu benefício de sobrevida global nesse de estudo de TGD de 60 dias no modelo em camundongo singênico C57BL/6 de carcinoma de cólon murídeo MC38.

Exemplo 12: Efeitos *in vivo* de Ab3 sobre a sobrevida em combinação com inibidor de PD-1 no modelo de TGF β 1/3

[499] EMT-6 é um modelo de tumor em camundongo ortotópico no qual o tratamento imune com inibidor de *checkpoint* isoladamente demonstrou efeitos limitados sobre o crescimento tumoral e a sobrevida. Os inventores reconheceram que, em certos modelos singênicos de tumor, múltiplas isoformas de TGF β são expressas, como avaliado por RNAseq. Tanto TGF β 1 quanto TGF β 3 são co-dominantes em EMT-6 (veja a FIG. 21), que são expressos em quantidades quase iguais. Os inventores, portanto, ponderaram que, nesse modelo particular, um pan-inibidor de isoformas de TGF β pode fornecer eficácia *in vivo* mais ampla, comparado com um inibidor isoforma-seletivo.

Design do estudo

[500] Para testar essa hipótese, fêmeas de camundongos Balb/c com 8-12 semanas de idade foram injetadas com 0,1 mL contendo 5×10^6 células de câncer de mama EMT6 em Matrigel 0% por via subcutânea no flanco. Os animais foram monitorados por todo o estudo quinzenalmente quanto ao peso e medição por compasso do tumor. Quando os tumores alcançaram o volume de 30-80 mm³, os animais foram randomizados em 6 grupos e a dosagem começou da seguinte forma: Grupo 1: HuNeg-rIgG1/HuNeg-mIgG1; Grupo 2: anti-PD1-rIgG1/HuNeg-mIgG1; Grupo 3: anti-PD1-rIgG1/ pan-Ab de TGF β -mIgG1; Grupo 4: anti-PD1-rIgG1/Ab3-mIgG1; Grupo 5: HuNeg-rIgG1/pan-Ab de TGF β -

mIgG1; e, Grupo 6: HuNeg-rIgG1/Ab3-mIgG1. O clone de anti-PD1 foi RMP1-14 (BioXCell) e administrado a 5 mg/kg, duas vezes por semana. HuNeg-rIgG1 foi usado como um controle de isótipo e dosado similarmente. Ab3-mIgG1 foi dosado a 30 mg/kg, uma vez por semana e HuNeg-mIgG1 foi dosado similarmente. Pan-TGF β Ab-mIgG1 foi dosado a 5 mg/kg duas vezes por semana. Toda a dosagem foi feita por via intraperitoneal a 10 mL/kg. Quando os tumores excederam 2.000 mm³, os animais foram sacrificados, foi coletado soro, e o tumor foi removido e congelado subitamente para eventual análise. Nenhum animal foi sacrificado em função de perda de peso corporal significativa, e um animal no Grupo 2 foi encontrado morto (não determinado como sendo relacionado ao tratamento).

Resultados

[501] EMT6 é um modelo singênico de tumor de progressão rápida. Os animais do Grupo 1 e do Grupo 6 tiveram uma sobrevida mediana de 18 dias, o que é típico do efeito de ausência de tratamento nesse modelo. Sabe-se que anti-PD1 possui um efeito limitado nesse modelo e, dessa forma, aumentou a sobrevida mediana até 19,5 dias quando administrado isoladamente (Grupo 2). O Grupo 5 também teve um pequeno aumento na sobrevida mediana até 21 dias. O Grupo 4 teve um aumento modesto na sobrevida até 25 dias com dois animais ainda vivos no dia 34. O Grupo 3 teve apenas 3 eventos de morte por volta do dia 34, indicando um efeito na sobrevida significativa dessa combinação. A inibição de TGF β 1 por meio de administração de Ab3-mIgG1 isoladamente não teve efeito sobre o crescimento do volume do tumor, no entanto, em conjunto com anti-PD1 5, os animais exibiram crescimento

tumoral menor e um animal exibiu resposta completa. Pan-TGF β Ab isoladamente tornou mais lento o crescimento tumoral em 3 animais, mas, em combinação com anti-PD1 4, os animais mostraram crescimento tumoral significativamente mais lento e 5 animais exibiram resposta completa. Esses achados são consistentes com informação publicamente disponível, por exemplo, a base de dados inteira de RNAseq de tumor (Crown Bioscience MuBase), que mostra que tumores EMT6 exibem níveis quase iguais de expressão de TGF β 1 e TGF β 3.

Exemplo 13: Efeitos de Ab2 e Ab3 sobre biomarcadores e fibrose renais em um modelo em camundongo de oclusão ureteral unilateral (UUO)

[502] O modelo em camundongo de oclusão ureteral unilateral tem sido amplamente usado para estudar fibrose intersticial, um processo patológico comum que pode levar à doença renal em estágio final (veja Isaka e cols. (2008) *Contrib. Nephrol.* 159: 109-21, e Chevalier (1999) *Pediatr. Nephrol.* 13: 612-9). Camundongos com UUO são caracterizados por ativação de miofibroblastos renais, atrofia tubular e fibrose intersticial, com lesões glomerulares mínimas (veja Lian e cols. (2011) *Acta Pharmacol. Sin.* 32: 1.513-21). Considera-se que a expressão aumentada de TGF β 1 tenha um papel no fenótipo observado em camundongos com UUO. Para avaliar o efeito de Ab2 sobre a apresentação de fibrose intersticial no modelo em camundongo de UUO, o seguinte experimento foi realizado.

[503] Resumidamente, machos de camundongos CD-1 com 7-8 semanas de idade (Charles River Laboratories) foram divididos em 4 grupos de camundongos (n = 10) que receberam a administração de Ab2 (3 mg/kg ou 30 mg/kg; volume de

dosagem de 10 mL/kg), anticorpo de controle IgG1 murídeo (30 mg/kg; volume de dosagem de 10 mL/kg) ou PBS, como controle de veículo, por via intraperitoneal (i.p.) antes da intervenção cirúrgica. Os tratamentos foram administrados um dia antes da cirurgia (d-1), um dia após a cirurgia (d1) e 3 dias após a cirurgia (d3). No dia 0 (d0), os camundongos foram anestesiados com anestesia com isoflurano em um cone nasal, e uma laparotomia realizada, seguida por cirurgia UUU unilateral direita permanente. Um grupo de camundongos de controle (n = 8) adicional recebeu a administração de PBS como descrito acima, mas foram submetidos exclusivamente a cirurgia simulada (ou seja, laparotomia sem oclusão do ureter). Imediatamente após o término do procedimento cirúrgico, todos os camundongos receberam uma injeção subcutânea de 0,001 mg/kg de buprenorfina. Os camundongos foram sacrificados cinco dias após a cirurgia e tecidos foram coletados para análise. Após a coleta, ambos os rins foram colocados em NaCl 0,9% gelado, desencapsulados e pesados. Foram avaliados os níveis de hidroxiprolina para avaliar o teor de colágeno do tecido renal. Os níveis de hidroxiprolina no rim, um marcador de fibrose e depósito de colágeno de tecido, estavam significativamente aumentados em camundongos que receberam intervenção cirúrgica, comparados com camundongos que recebem cirurgia simulada.

[504] Um corte transversal médio de cada rim direito foi fixado por imersão em formalina neutra tamponada 10% por 48 horas, que foi então transferido para etanol 70% para processamento e análise histológicos. Os cortes de rim fixados foram embebidos em parafina, cortados (três cortes seriais de 5 µm adquiridos com espaçamento de 200–250 µm por

rim de animal para permitir uma amostragem maior e representação de lesão renal), corados com Vermelho-Picrosirius, e submetidos a análises histológicas quantitativas usando segmentação do espectro de cor para determinar a fração do volume de colágeno cortical (CVF). Uma pontuação de CVF composta foi calculada para cada animal por determinação da pontuação de CVF média para cada um dos três cortes seriais. Análises estatísticas foram realizadas com o uso do teste-t não pareado. Como mostrado na FIG. 12K, fibrose cortical renal, como determinada por CVF, estava aumentada em rins obstruídos por UUO, comparados com camundongos com tratamento simulado de controle. Camundongos que recebem 3 mg/kg ou 30 mg/kg de Ab2 mostraram uma atenuação significativa nos aumentos induzidos por UUO em CVF, comparados com camundongos que recebem controle de veículo (PBS) ou controle de IgG.

[505] Os níveis relativos da expressão de mRNA de inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1), fator do crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), TGF β 1, fibronectina-1, actina- α de músculo liso (SMA- α), proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1), colágeno tipo I alfa 1 (Colla1) e cadeia alfa 1 de colágeno tipo III (Col3a1) no tecido renal coletado foram determinados (FIG. 12A-12H). Os níveis de mRNA foram normalizados usando os níveis de mRNA do gene de manutenção de hipoxantina fosforribosiltransferase 1 (HPRT1). Além disso, em camundongos que recebem 3 mg/kg ou 30 mg/kg de Ab2 antes da intervenção cirúrgica, os níveis de mRNA de PAI-1, CTGF, TGF β 1, fibronectina 1, Colla1 e Col3a1 estavam significativamente diminuídos, comparados com camundongos que

recebem 30 mg/kg de controle de IgG1. Em camundongos que recebem 3 mg/kg de Ab2 antes da intervenção cirúrgica, os níveis de mRNA de SMA- α estavam significativamente diminuídos, comparados com camundongos que recebem 30 mg/kg de controle de IgG1. Além disso, em camundongos que recebem 30 mg/kg de Ab2 antes da intervenção cirúrgica, os níveis de mRNA de MCP-1 estavam significativamente diminuídos, comparados com camundongos que recebem 30 mg/kg de controle de IgG1.

[506] O efeito de Ab3 sobre os níveis de expressão de mRNA de marcadores de fibrose conhecidos também foi avaliado. Como mostrado nas FIGS. 12I e 12J, em camundongos que recebem 3 mg/kg ou 30 mg/kg de Ab3 antes da intervenção cirúrgica, os níveis de mRNA de PAI-1 e Colla1 estavam significativamente diminuídos, comparados com camundongos que recebem controle de IgG1.

[507] Em resumo, foram observados efeitos significantes em camundongos tratados com Ab2 ou Ab3 no modelo de UUO em camundongos, com exceção dos níveis de hidroxiprolina. Como mostrado nas FIGS. 12A-12H e 12K, Ab2 o tratamento atenuou significativamente os aumentos induzidos por UUO em CVF, e diminuiu significativamente a expressão gênica de marcadores de fibrose conhecidos, por exemplo, PAI-1, CTGF, TGF β 1, fibronectina 1, Colla1 e Col3a1. Similarmente, como mostrado nas FIGS. 12I-12J, o tratamento com Ab3 diminuiu significativamente a expressão gênica de marcadores de fibrose conhecidos, por exemplo, PAI-1 e Colla1. Esses dados demonstram que TGF β 1 é a forma principal de TGF β , desempenhando um papel na doença renal e que, surpreendentemente, TGF β 2 e TGF β 3 provavelmente não estão

envolvidos na patogênese.

Exemplo 14: Efeito de anticorpo TGF β 1-específico, contexto-independente, sobre o modelo de fibrose renal de Alport murídeo

[508] O modelo murídeo Col4a3 -/- é um modelo genético estabelecido de síndrome de Alport autossômica recessiva. Camundongos Alport não possuem colágeno 4 A3 funcional (Col4A3-/-) e, portanto, não podem formar colágeno tipo IV, que exige cadeias α 3, α 4 e α 5. Camundongos Col4a3-/- desenvolvem fibrose no rim consistente com fibrose renal em pacientes humanos, incluindo glomeruloesclerose, fibrose intersticial e atrofia tubular, e todos os camundongos Col4a3-/- desenvolvem doença renal em estágio final (ESRD) entre 10 e 30 semanas de idade, dependendo da base genética do camundongo. A manifestação estrutural e funcional de patologia renal em camundongos Col4a3-/-, combinadas com a progressão para ESRD, tornam os camundongos Col4a3-/- um modelo ideal para compreender a fibrose renal. Relatos prévios apontam para a importância da via de sinalização de TGF β nesse processo, e o tratamento com integrina α v β 6, um ativador de TGF β conhecido ou com uma armadilha para o ligante de TGF β foi relatado para evitar fibrose e inflamação renais em camundongos Alport (Hahm e cols. (2007) *The American Journal of Pathology*, 170 (1): 110-125).

[509] Ab3, que é um inibidor da ativação de TGF β 1 isoforma-específico, contexto-independente, foi testado quanto à sua habilidade para inibir ou mitigar fibrose renal em camundongos Alport da seguinte forma.

[510] A prole F1 de cruzamento heterozigoto X heterozigoto 129:B16 (modelo de progressão média) foi

empregada para o estudo. A dosagem de anticorpo para Ab3 começou seis semanas após o nascimento, a 5 mg/kg, duas vezes por semana (ou seja, 10 mg/kg/semana) por uma duração de teste de seis semanas. Um pan-anticorpo neutralizante de TGF β foi usado como controle positivo (dosado a 5 mg/kg, duas vezes por semana), enquanto IgG foi usada como controle negativo. Todos os anticorpos foram administrados por meio de injeção intraperitoneal. Após seis semanas de tratamento com anticorpo (12 semanas após o nascimento), os animais foram sacrificados, e os rins foram coletados para análises.

[511] Está bem documentado que a ativação do receptor de TGF β leva a uma cascata de sinalização a jusante de eventos intracelulares, incluindo fosforilação de Smad2/3. Portanto, os efeitos do tratamento com anticorpo Ab3 foram avaliados em amostras de lisados de rim por medição dos níveis relativos de fosforilação de Smad2/3, como avaliado por ELISA (Cell Signaling) de acordo com as instruções do fabricante. A FIG. 15 fornece um gráfico que mostra proporções relativas de Smad2/3 fosforilado vs. total (fosforilado e não fosforilado). Lisados de rim inteiro preparados a partir de amostras de animais tratados com Ab3 mostraram uma redução significativa na fosforilação relativa de Smad2/3, comparado com controle negativo. As proporções médias foram equivalentes àsquelas do controle heterozigoto.

[512] Os camundongos Alport F1 com 12 semanas de idade descritos acima exibiram evidências precoces de fibrose renal no momento do término do estudo, como medido por depósitos de colágeno (quantificação com Vermelho-Picrosirius) e acúmulo de nitrogênio ureico no sangue (BUN), cada um deles indicativo de fibrose. Consistente com as

atividades inibidoras de Ab3 observadas na sinalização de receptor de TGF β a jusante, tecidos tratados com Ab3 mostraram sinais reduzidos de fibrose. Por exemplo, o nível de BUN médio para animais Alport de controle que não receberam tratamento com Ab3 foi de mais de 50 mg/dL, enquanto o nível de BUN médio em animais tratados com Ab3 foi reduzido a menos do que 30 mg/dL, sugerindo que Ab3 pode ser capaz de melhorar a fibrose.

Exemplo 15: Efeito de anticorpo TGF β 1-específico, contexto-independente, na fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono

[513] As atividades de TGF β foram implicadas como participantes da patologia da fibrose de órgão, por exemplo, fibrose hepática. Foi relatado previamente que um agente TGFBR1I solúvel evita a fibrose hepática no modelo de fibrose hepática por tetracloreto de carbono (CCl₄) (Yata e cols., *Hepatology*, 2002). Similarmente, a inibição de TGF β 1 anti-senso (por meio de liberação adenoviral) melhora a fibrose hepática em consequência de ligação do ducto biliar (Arias e cols., *BMC Gastroenterology*, 2003). Além disso, 1D11, um pan-anticorpo de TGF β que neutraliza todas as isoformas de TGF β , demonstrou que reduz fibrose hepática e colangiocarcinomas em ratos tratados com TAA (Ling e cols., *PLoS ONE*, 2013).

[514] Aqui, o modelo de fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄) em camundongos foi usado para avaliar os efeitos de um inibidor da ativação de TGF β 1 contexto-independente, sobre a fibrose *in vivo*. Fibrose hepática foi induzida em machos de camundongos BALB/c com CCl₄, que foi dado duas vezes por semana por seis semanas

por via i.p. Após as primeiras duas semanas de tratamento com CCl₄, os animais foram tratados com dosagem terapêutica semanalmente de Ab3 (30 mg/kg). A dosagem terapêutica com anticorpos foi iniciada após duas semanas e continuo por quatro semanas.

[515] Os animais foram randomizados com base em dados da química do sangue. Durante as quatro semanas da dosagem de Ab3 do estudo, amostras de sangue foram retiradas para análise de AST/ALT e bilirrubina total do soro. Os animais foram pesados duas vezes por semana para monitorar o peso corporal durante o estudo. Após o estudo de seis semana, o fígado e o baço foram coletados e pesados para determinar a proporção de peso fígado/baço. A patologia do fígado foi avaliada por histologia em fatias do fígado coradas com Vermelho-Picrosirius. A extensão da fibrose hepática foi pontuada de acordo com cortes corados com Masson ou Vermelho-Picrosirius e visualização sob lente objetiva de 10 ou 20 X em todo o corte com os critérios listados abaixo:

Tabela 14. Critérios para pontuação de fibrose.

	Espessamento da veia central	Inter-sinusoidal	Portal	Fibrose
Pontuação	(CLV)	(PS)	(PT)	Áreas de envolvimento (NS) Camadas de fibras (WS)
0	Normal	Nenhum	Nenhum	Nenhum
1	Ligeiramente espessada	Focal	Quantidade leve	≤6 camadas finas e não conectadas
2	Moderadamente espessada	Quantidade moderada	Quantidade moderada	> 6 camadas espessas e conectadas

3	Indistinguível	Quantidade extensa	Cirroze	Formação de nódulos tecidos fibróticos densos
4	–	–	–	>2/3 do corte

[516] As pontuações fibróticas foram então calculadas usando a fórmula $SSS = CLV + OS + PT + 2 \times (NS \times WS)$, que leva em conta espessamento da veia central, Intersinusoidal, Portal, e áreas afetadas e camadas do tecido.

[517] Como resumido na FIG. 14, quatro doses semanais de tratamento com Ab3 reduziram significativamente fibrose hepática induzida por CCl4.

[518] Similarmente, os efeitos antifibróticos de Ab2 e Ab3 em várias doses (3, 10 e 30 mg/kg) foram examinados por quantificação histológica (% da área) de coloração com Vermelho-Picrosirius em cortes fixados em formalina, embebidos em parafina, de um único lobo do fígado. A quantificação foi realizada por um patologista de forma cega. Consistente com a observação fornecida acima, os cortes do fígado de animais tratados com anticorpo mostraram fibrose induzida por CCl4 significativamente reduzida, como medida por coloração com Vermelho-Picrosirius, que corresponde às quantidades relativa de colágeno do tecido. Os resultados mostraram que cada um de Ab2 e Ab3 foi eficaz na redução de fibrose hepática, até mesmo na menor dose testada (3 mg/kg). Mais especificamente, animais tratados com CCl4 que receberam tratamento com Ab2 a 3 mg/kg reduziram a fração de volume colágeno (% da área) para 2,03%, comparado com

controle de IgG (3,356%) ($p < 0,0005$). Similarmente, animais tratados com CCl₄ que receberam tratamento com Ab3 a 3 mg/kg reduziram a fração de volume de colágeno (% da área) para 1,92%, comparado com controle de IgG (3,356%) ($p < 0,0005$). Animais de controle negativo duplo que não receberam tratamento com CCl₄ mostraram uma fração de volume de colágeno de fundo de 1,14%.

[519] Além disso, dados preliminares indicam que o tratamento com Ab3 causou redução significativa nos níveis de SMAD2/3 fosforilado, como medido por ELISA como proporções de SMAD2/3 fosfo-para-total, indicando que a via de transdução de sinal de TGF β a jusante foi suprimida por administração do inibidor de TGF β 1 contexto-independente *in vivo*.

Exemplo 16: Papel de TGF β 1 na distrofia muscular

[520] TGF β desempenha vários papéis na função do músculo esquelético, incluindo inibição de miogênese, regulação de inflamação e reparo muscular, e promoção de fibrose. Embora haja um interesse considerável na inibição de TGF β como uma terapia para uma ampla gama de doenças, incluindo distrofias musculares, essas terapias inibem TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3, independentemente do contexto molecular. A ausência de especificidade/seletividade desses inibidores pode resultar em efeitos colaterais indesejados que levam a doses clínicas com eficácia insuficiente. Embora tenha sido relatado que moléculas pan-inibidoras de TGF β melhorem a função muscular e reduzam a fibrose no camundongo mdx, ainda está para ser esclarecido se aqueles efeitos são causados por inativação de TGF β 1, β 2 ou β 3.

[521] Para essa finalidade, foram gerados anticorpos que

bloqueiam especificamente a ativação de TGF β 1 latente mediada por integrina, que poupam TGF β 2 e β 3. Camundongos D2.mdx são tratados com anticorpos específicos para pró-TGF β 1, de modo a verificar o papel de TGF β 1 especificamente no reparo muscular no músculo distrófico. Os efeitos funcionais da inibição de TGF β 1 sobre a proteção da lesão induzida por contração são avaliados, bem como sobre a recuperação do mesmo método de lesão. A avaliação histológica inclui se o tratamento afeta o dano muscular, fibrose e inflamação. Adicionalmente, possíveis toxicidades podem ser avaliadas para determinar se os efeitos negativos observados relatados com a pan-inibição de TGF β no músculo (por exemplo, inflamação aumentada, de déficits de longo prazo na função muscular) são decorrentes da inibição de TGF β 1 ou TGF β 2/3. Para compreender se a inibição de TGF β 1 em contextos moleculares específicos é mais eficaz e/ou possui menos efeitos negativos (efeitos adversos), a eficácia de inibidores de LTBP-pró-TGF β 1 nesse modelo pode ser avaliada a fim de esclarecer o papel de TGF β 1 apresentado pela célula imune daquele apresentado na matriz extracelular (ECM), levando potencialmente a terapias antifibróticas mais seguras e/ou mais eficazes.

[522] O músculo distrófico é altamente suscetível à lesão induzida por contração. Após a lesão, o músculo de camundongos mdx mostra uma redução significativa na geração de força e captação aumentada do corante Azul de Evan, indicativa de lesão/dano físico à fibra muscular, comparado com WT (Lovering, R.M., e cols., *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 2007. 88 (5): páginas 617-25). Agentes terapêuticos que reduzem a extensão da lesão induzida por contração, ou

melhorar a recuperação após lesão, seriam de benefício clínico significativo para pacientes com distrofia muscular (Bushby, K., e cols., *Lancet Neurol.*, 2010. 9 (1): páginas 77-93). Inibidores de teste, por exemplo, Ab1, Ab2 e Ab3, podem ser avaliados quanto à sua habilidade para i) evitar lesão induzida por contração, bem como ii) promover a recuperação da lesão. A cepa D2.mdx pode ser usada para nossos experimentos, ao contrário da cepa mdx tradicional no nível de fundo B10. Esses camundongos, gerados por cruzamento do mdx sobre um nível de fundo DBA2/J, possuem a variante não protetora de LTBP4 descrita acima e, portanto, exibem patologia de doença que é mais severa, progressiva e similar à doença humana do que a cepa mdx padronizada (Coley, W.D., e cols., *Hum. Mol. Genet.*, 2016. 25 (1): páginas 130-45). Na medida em que os camundongos D2.mdx estão sendo usados, camundongos DBA2/J podem servir como controles do tipo selvagem. Como DMD afeta primariamente machos, os estudos podem se concentrar em camundongos machos.

[523] Para examinar a habilidade de Ab1 e Ab2 para evitar/Limitar lesão induzida por contração, camundongos D2.mdx machos com 6 semanas de idade (n = 10) são tratados com 10 mg/kg/semana de controle de IgG, Ab1 ou Ab2 por 6 semanas. Para permitir a comparação com trabalho publicado com o uso de um pan-inibidor TGF β , um quarto grupo é dosado com 10 mg/kg/semana de 1D11. Todos os anticorpos são de isótipo mIgG1 e foi demonstrado previamente que essa dose é eficaz no modelo de UUO (FIGS. 12A-12K). Um grupo WT dosado com o controle de IgG também é incluído. 24 horas antes do sacrifício, os camundongos recebem a administração de corante Azul de Evan (EBD) 1% em PBS (volume de 1% do peso

corporal) para permitir a avaliação de dano de miofibra por microscópio de fluorescência. Ao final do tratamento, os camundongos são submetidos a um protocolo de contração excêntrica *in vivo*. A lesão excêntrica do músculo gastrocnêmio será realizada com um sistema de alavanca muscular 305B (Aurora Scientific), como descrito (Khairallah, R.J., e cols., *Sci. Signal.*, 2012. 5 (236): página ra56). Resumidamente, são realizadas 20 contrações excêntricas com pausas de 1 minuto entre elas, e diminuição na força isométrica de pico antes que a fase excêntrica possa ser considerada como uma indicação de dano muscular. A extensão da perda de força e o percentual de fibras EBD-positivas podem ser determinados. Camundongos DBA2/J submetidos a esse protocolo perdem 30-40% da força inicial após 20 contrações excêntricas. Em contraste, camundongos D2.mdx perdem 80% da força inicial seguindo o mesmo protocolo, como descrito previamente (Pratt, S.J., e cols., *Cell. Mol. Life Sci.*, 2015. 72 (1): páginas 153-64; Khairallah, R.J., e cols., *Sci. Signal.*, 2012. 5 (236): página ra56). A habilidade de Ab1 e Ab2 para reduzir a perda de força após lesão pode ser avaliada. Os camundongos são sacrificados ao final do experimento e músculos gastrocnêmicos tanto lesionados quanto não lesionados podem ser coletados para análises histológicas. A captação de EBD pode ser avaliada de ambos os músculos. A área da seção transversal da miofibra e a extensão de fibrose podem ser medidas. Para determinação da área da seção transversal, cortes da parte média do músculo podem ser corados com aglutinina de germe de trigo conjugada a um fluoróforo para visualizar membranas celulares. Os cortes podem ser

digitalizados com o uso de microscópio fluorescente, os limites da célula traçados usando software preditivo e a área da seção transversal determinada por meio de medições automatizadas equilibradas. Para análise de fibrose, os cortes podem ser corados com Vermelho-Picrosirius (PSR) e a área de PSR+ por lâmina computada.

[524] A habilidade de Ab1, Ab2 ou Ab3 para acelerar a recuperação da lesão induzida por contração é avaliada. Camundongos DBA2/J e D2.mdx com 12 semanas de idade podem ser submetidos ao mesmo protocolo de contração excêntrica descrito acima. Após a lesão, os camundongos são divididos em grupos de tratamento (n = 10) e recebem a administração de um controle de IgG (para camundongos WT e D2.mdx), 1D11, Ab1, Ab2 ou Ab3 (somente D2.mdx). Os anticorpos podem ser dosados a 10 mg/kg/semana pela duração do experimento. Sete e 14 dias pós-lesão, a força isométrica de pico máxima, a proporção *twitch-to-tetanic* e o relacionamento força-frequência podem ser medidos para avaliar o efeito do tratamento sobre a recuperação da lesão. Embora Ab1, Ab2 e Ab3 inibam a liberação de TGF β 1 independentemente da molécula apresentadora, a liberação seletiva de TGF β 1 pela matriz extracelular (ou seja, apresentado por LTBP) poderia ter um benefício maior na DMD em consequência da preservação da atividade de Treg dirigida por TGF β 1. Para abordar essa questão, anticorpos inibidores específicos de LTBP-pró-TGF β 1 também podem ser avaliados tanto quanto à habilidade para evitar lesão induzida por contração quanto para acelerar a recuperação da lesão.

Exemplo 17: Papel de TGF β 1 na regeneração do músculo esquelético após lesão aguda.

[525] O papel de TGF β 1 especificamente na regeneração da miofibra após lesão muscular pode ser investigado. Anticorpos TGF β 1-específicos podem ser empregados no modelo de lesão por cardiotoxina para determinar o papel de TGF β 1 especificamente durante a regeneração da miofibra. A regeneração pode ser avaliada histologicamente e avaliações funcionais da força e qualidade musculares podem ser efetuadas. Considerando os benefícios potenciais da inibição de TGF β 1 para a regeneração muscular, terapias que possuem efeitos benéficos sem as toxicidades observadas com a pan-inibição TGF β seriam altamente benéficas. Isso permite uma investigação dos efeitos da inibição TGF β 1-específica sobre a função da célula satélite e pode fornecer dados sobre estudos de transplante de célula satélite.

[526] Como descrito acima, TGF β parece ter múltiplos efeitos sobre a biologia muscular, incluindo inibição da proliferação e diferenciação de mioblastos, bem como a promoção de atrofia e fibrose (Allen, R.E. e L.K. Boxhorn, *J. Cell. Physiol.*, 1987. 133 (3): páginas 567-72; Brennan, T.J., e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991. 88 (9): páginas 3.822-6; Massague, J., e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1986. 83 (21): páginas 8.206-10; Olson, E.N., e cols., *J. Cell. Biol.*, 1986. 103 (5): páginas 1.799-805; Li, Y., e cols., *Am. J. Pathol.*, 2004. 164 (3): páginas 1.007-19; Mendias, C.L., e cols., *Muscle Nerve*, 2012. 45 (1): páginas 55-9; Nelson, C.A., e cols., *Am. J. Pathol.*, 2011. 178 (6): páginas 2.611-21). No entanto, esses estudos usavam TGF β 1 recombinante em cultura ou injetado em camundongos e podem ter resultados não fisiológicos, já que o fator do crescimento é removido de seu contexto molecular.

Alternativamente, os investigadores usaram inibidores de TGF β que não são seletivos para TGF β 1.

[527] Para avaliar os efeitos isoforma-específicos, contexto-permissivos, de TGF β 1, múltiplos anticorpos contra pró-TGF β 1 (por exemplo, Ab3) podem ser examinados quanto à sua habilidade para afetar a regeneração muscular após lesão induzida por CTX. Esses anticorpos são inibidores "isoforma-específicos" e "contexto-permissivos" da ativação de TGF β 1, de modo que eles inibem especificamente a liberação de TGF β 1 (ao contrário de TGF β 2 ou TGF β 3) por qualquer molécula apresentadora e não se ligam aos fatores do crescimento maduros (FIG. 4B).

[528] A regeneração muscular pode ser induzida em machos de camundongos DBA2/J (n = 10) por meio de injeção de CTX no músculo gastrocnêmio direito. Um dia antes da lesão, os camundongos podem receber a administração de 10 mg/kg de controle de IgG, 1D11, Ab1 ou Ab2. Os anticorpos são continuados até serem dosados semanalmente até o final do estudo. Em 7 e 14 dias pós-lesão, medições da força muscular podem ser feitas *in vivo* com um sistema de alavanca muscular 305C (Aurora Scientific Inc., Aurora, CAN). Resumidamente, para o grupo do músculo flexor dorsal, são evocadas contrações por estímulo elétrico percutâneo do nervo ciático em camundongos anestesiados, e uma série de estímulos é então realizada em frequência crescente de estímulos (pulso de 0,2 ms, duração do trem de 500 ms): 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 Hz, seguidos por um estímulo final a 1 Hz. A força isométrica de pico máxima, a proporção *twitch-to-tetanic* e o relacionamento força-frequência serão determinados. Após as medições de força, os músculos gastrocnêmio e solear

lesionados são coletados e preparados para histologia. A área de corte transversal da miofibra e a área %PSR+ podem ser determinadas como descrito no Exemplo 8 acima.

[529] O tratamento com Ab3 pode resultar em fibrose reduzida e função muscular melhorada. No entanto, considerando o papel de TGF β 1 na regulação da ativação imune, é possível que possamos observar inflamação aumentada com os anticorpos, como foi relatado com o tratamento com 1D11 (Andreetta, F., e cols., *J. Neuroimmunol.*, 2006. 175 (1-2): páginas 77-86). Caso a inflamação aumentada possa limitar os efeitos terapêuticos da inibição de TGF β 1, anticorpos contexto-específicos podem ser subsequentemente avaliados para fornecer um grau adicional de especificidade, o que pode limitar a toxicidade. Por exemplo, anticorpos que inibem a liberação de TGF β 1 por LTBP β s só podem ser usados com a utilização das leituras e métodos descritos acima. Esses anticorpos podem limitar a liberação de TGF β 1 apenas pela ECM, sem afetar a liberação por Tregs ou macrófagos.

Exemplo 18: Seleção de agentes inibidores de TGF β 1 adequados em distúrbios musculares.

[530] A análise da expressão de pró-TGF β 1 e suas moléculas apresentadoras em músculo saudável, em regeneração e doente pode fornecer informação útil para ajudar na seleção de uma abordagem terapêutica ótima. Considerando os benefícios potenciais da inibição de TGF β 1 na regeneração e reparo musculares, a compreensão do contexto da apresentação de pró-TGF β 1 (por exemplo, na ECM ou em células imunes) no músculo esquelético sob diferentes condições (saudável, agudamente lesionado e cronicamente lesionado) pode ajudar a informar a utilidade terapêutica de anticorpos e, em última

análise, fornecer uma percepção do grau de especificidade/seletividade necessários para obter tanto eficácia clínica quanto segurança. A natureza da apresentação de TGF β 1 pode variar dependendo do estado de saúde do músculo e ao longo da evolução da doença, o que poderia ter implicações para quaisquer terapias direcionadas ao TGF β 1. A compreensão dos perfis de expressão dessas moléculas também irá ajudar na seleção do tempo de dosagem apropriado para moléculas terapêuticas potenciais. Com o uso de *western blot*, imunoistoquímica e imunoprecipitação, a expressão de pró-TGF β 1 e suas moléculas apresentadoras pode ser avaliada em músculo normal, agudamente lesionado (lesão por cardiotoxina) e cronicamente em regeneração (camundongo D2.mdx). A expressão dessas moléculas pode ser investigada especificamente em tipos de células ou subconjunto de tipos de células cruciais (por exemplo, células satélites, macrófagos, progenitores fibro-adipogênicos etc.) nas diferentes condições descritas acima.

[531] Embora a expressão de isoformas de TGF β tenha sido examinada em músculos de camundongos mdx, trabalho prévio se concentrou na expressão dos fatores do crescimento maduros (Nelson, C.A., e cols., *Am. J. Pathol.*, 2011. 178 (6): páginas 2.611-21; Zhou, L., e cols., *Neuromuscul. Disord.*, 2006. 16 (1): páginas 32-8). Considerando a especificidade de alvo dos anticorpos contra TGF β 1 descritos nesse relatório descritivo, é essencial que os padrões de expressão sejam examinados não apenas para TGF β 1 maduro e pró-TGF β 1, mas também aqueles das moléculas apresentadoras, o que deveria fornecer informação quanto à fonte e/ou contexto de um pool de TGF β 1 de interesse. Idealmente, é desejável ganhar

compreensão dos padrões de expressão dos complexos latentes, não simplesmente de cada componente.

[532] Os anticorpos são avaliados por *western blot* e IHC para os alvos de interesse. Anticorpos contra TGF β 1-LAP, LTBP1, LTBP3 e LTBP4 de camundongo são disponíveis comercialmente. O anticorpo contra TGF β 1-LAP (clone TW7-16B4) foi intensamente caracterizado e é eficaz tanto em citometria de fluxo quanto em *western blot* (Oida, T. e H.L. Weiner, *PLoS One*, 2010. 5 (11): página e15523). Anticorpos contra LTBP1 (ProteinTech # 22065-1-AP) e LTBP3 (Millipore #ABT316) foram validados internamente usando células SW480 transfectadas com LTBP1-pró-TGF β 1 ou LTBP3-pró-TGF β 1 e demonstraram que são específicos para seus alvos. A utilidade desses anticorpos para IHC pode ser determinada. Músculos de camundongos saudáveis e D2.mdx são cortados e os anticorpos testados em cortes congelados e FFPE. Os anticorpos podem ser validados por inclusão de condições com 100x de excesso de proteína-alvo ou complexo purificado (feitos internamente) para assegurar que o sinal observado é específico.

[533] Trabalho anterior identificou anticorpos que se ligam especificamente a certo complexo latente, mas não possui atividade inibidora. A ligação ao antígeno por esses anticorpos foi confirmada por ELISA (FIG. 4C) e também podem ser avaliados quanto à sua utilidade em IHC (considerando a estrutura tridimensional desses epítopos, esses anticorpos têm pouca probabilidade de serem eficazes como reagentes de *western blot*). A presença de complexos de TGF β 1 latente de tecido volumoso também pode ser avaliada por *western blot* ou imunoprecipitação. Complexos latentes podem ser

identificados por *western blot* por processamento da mesma amostra sob condições redutoras e não redutoras. Sob condições redutoras, TGF β 1, LAP e a molécula apresentadora se separam, e as três moléculas podem ser identificadas no mesmo *blot*, mas usando métodos de *western blot* de duas cores. Sob condições não redutoras, o complexo LAP:molécula apresentadora permanece associado, enquanto TGF β 1 é liberado; o complexo migra mais lentamente do que a molécula apresentadora vazia e migra junto com TGF β 1-LAP. Vários anticorpos também são avaliados quanto à sua habilidade para imunoprecipitar complexos latentes de músculo para demonstrar ligação de TGF β 1 direta a moléculas apresentadoras específicas.

[534] Após terem sido identificados anticorpos apropriados, a expressão em músculo saudável, em regeneração e distrófico é avaliada, por *western* e/ou IHC, dependendo dos anticorpos disponíveis. O músculo tibial anterior (TA) e o diafragma podem ser coletados de camundongos DBA2/J e D2.mdx em 4, 8 e 12 semanas de idade. Para músculo em regeneração, cardiotoxina pode ser injetada no TA de camundongos DBA2/J de 12 semanas de idade, e os músculos coletados em 3, 7 e 14 dias pós-lesão. Tecidos de pelo menos 4 camundongos podem ser usados para cada condição/ponto do tempo. Experimentos de co-coloração também podem ser realizados para identificar populações de células que expressam as várias moléculas (por exemplo: CD11b para macrófagos, FoxP3 para Tregs, MyoD para células miogênicas).

Exemplo 19: Ab2 e Ab3 exibem toxicidade reduzida comparados com o inibidor de ALK5 quinase LY2109761 e um pan-anticorpo de TGF β

[535] Para avaliar a toxicidade de Ab2 e Ab3, comparados com o inibidor de receptor de TGF- β tipo I (ALK5) quinase de pequena molécula LY2109761 e com um pan-anticorpo de TGF β (hIgG4), foram realizados estudos de toxicidade em ratos. O rato foi selecionado como a espécie para esse estudo de segurança com base em relatos prévios de que ratos são mais sensíveis à inibição de TGF β , comparados com camundongos. Toxicidades similares observadas em ratos também foram observadas em outras espécies de mamíferos, por exemplo, cães, primatas não humanos, bem como humanos.

A. Fase I do estudo

[536] Resumidamente, fêmeas de ratos F344/NHsd receberam a administração de Ab2 a 3 mg/kg (1 grupo, n = 5), a 30 mg/kg (1 grupo, n = 5) ou a 100 mg/kg (1 grupo, n = 5); um pan-anticorpo de TGF β a 3 mg/kg (1 grupo, n = 5), a 30 mg/kg (1 grupo, n = 5) ou a 100 mg/kg (1 grupo, n = 5); LY2109761 a 200 mg/kg (1 grupo, n = 5) ou 300 mg/kg (1 grupo, n = 5); ou controle de veículo de PBS (pH 7,4) (1 grupo, n = 5). Animais que recebem Ab2, o pan-anticorpo de TGF β ou o controle de veículo foram dosados uma vez por via intravenosa (no dia 1), e os ratos que recebem LY2109761 foram dosados por gavagem oral uma vez ao dia durante 7 dias (7 doses). O peso corporal do animal foi determinado nos dias 1, 3 e 7 da fase de dosagem. Os animais foram sacrificados no dia 8 e foram feitas necropsias.

[537] Como mostrado nos dados de sobrevida mostrados na FIG. 17A, Ab2 exibiu toxicidade reduzida comparado com os outros grupos de tratamento. Todos os animais que receberam a administração de 300 mg/kg do inibidor de ALK5 quinase LY2109761 foram sacrificados em uma condição moribunda ou

foram encontrados mortos nos dias 3, 6 ou 7 do estudo. Dois dos animais administrados com 200 mg/kg de LY2109761 foram encontrados mortos no dia 7 do estudo. Um animal administrado com 100 mg/kg do pan-anticorpo de TGF β foi encontrado morto no dia 6 do estudo. Todos os animais administrados com até 100 mg/kg de Ab 2 sobreviveram até o sacrifício terminal.

[538] Similarmente, como mostrado nos dados de sobrevivência mostrados na FIG. 19A, ratos tratados com Ab3 exibiram toxicidade reduzida, quando comparados com os outros grupos de tratamento. Um animal administrado com 100 mg/kg do pan-anticorpo de TGF β foi encontrado morto no dia 6 do estudo. Todos os animais administrados com até 100 mg/kg de Ab3 sobreviveram até o sacrifício terminal.

[539] Além disso, a toxicidade dos tratamentos foi avaliada por monitoramento dos pesos corporais dos animais durante a fase de dosagem. Como mostrado nas FIGS. 18B-18E, animais que recebem LY2109761 a 200 mg/kg ou 300 mg/kg exibiram peso corporal diminuído durante a evolução do estudo.

[540] O peso dos órgãos do animal também foi avaliado *post-mortem*. Como mostrado na Tabela 11, pesos aumentados dos corações foram observados em animais administrados com > 200 mg/kg de LY2109761. Pesos aumentados dos corações também foram observados em animais administrados com > 30 mg/kg do pan-anticorpo de TGF β . Nenhum efeito sobre o peso de órgãos foi observado em animais administrados com até 100 mg/kg de Ab2 ou Ab3.

Tabela 11. Alterações no peso de órgãos em grupos de tratamento.

	Grupo de tratamento
--	---------------------

	Controle de veículo ^a	LY2109761		Pan-anticorpo de TGF β		
Nível de dose (mg/kg/dia)	0	200	300	3	30	100
Coração						
Peso absoluto (g)	0,4084	112	NE	99	123	119
Proporção do peso corporal (%)	0,3952	132	NE	96	122	122
Proporção do peso cerebral (%)	26,3420	113	NE	98	123	116

NE = não avaliado em decorrência de mortalidade precoce.

Observação: valores para peso absoluto e proporção de pesos de órgãos (em relação ao corpo ou cérebro) para cada grupo de tratamento expressos como valor médio do controle de percentagem.

^a Controle de veículo = solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4.

[541] Embora nenhum achado macroscópico tenha sido observado em animais administrados com até 100 mg/kg de Ab2 ou do pan-anticorpo de TGF β , um esterno com formato anormal foi observado em quatro animais de cada grupo de tratamento que recebeu 200 mg/kg ou 300 mg/kg de LY2109761. Foram observados 2,5 mL de fluido transparente na cavidade torácica e um timo aumentado em decorrência de excesso de fluido (ou seja, edema) em um animal administrado com 300 mg/kg de LY2109761, que foi encontrado morto no Dia 3 do estudo.

[542] Como mostrado na Tabela 12, no nível microscópico, animais administrados com 200 mg/kg de LY2109761 exibiram achados na válvula cardíaca (ou seja, valvulopatia). Valvulopatia foi caracterizada por espessamento da válvula cardíaca em consequência de hemorragia, hiperplasia endotelial, infiltrados de células inflamatórias mistas e/ou hiperplasia estromal (veja a FIG. 18F, painel direito

superior). A maioria dos animais tinha múltiplas valvas afetadas. Adicionalmente, achados no átrio foram observados, incluindo infiltrados de células inflamatórias mistas mínimos a discretos, hemorragia mínima e/ou hiperplasia mínima do endotélio (endocárdio) resultando em coloração basofílica aumentada do átrio em cortes corados com hematoxilina e eosina. Os achados no miocárdio também foram observados principalmente na base do coração e consistiam em degeneração/necrose mínima a discreta, ligeira hemorragia e/ou ligeiros infiltrados de células inflamatórias mistas. Um animal administrado com 300 mg/kg de LY2109761 teve ligeira necrose com inflamação de uma artéria coronária. Além disso, dois animais administrados com 200 mg/kg de LY2109761 tiveram infiltrados de células inflamatórias mistas mínimo ou hemorragia na raiz aórtica.

Tabela 12. Achados microscópicos no coração em animais que recebem LY2109761.

		LY2109761		
Nível de dose (mg/kg/dia)		0	200	300
Coração				
<u>Válvulas</u> <u>cardíacas</u> Valvulopatia				
	Mínima	0	1	2
	Ligeira	0	3	3
	Moderada	0	1	0
<u>Átrio</u> Infiltrado, células mistas				
	Mínimo	0	2	3
	Ligeiro	0	0	1
Hiperplasia, endotélio				
	Mínima	0	1	3
Hemorragia				
	Mínima	0	1	2

<u>Miocárdio</u> Degeneração/ necrose				
	Mínima	0	0	1
	Ligeira	0	1	1
Hemorragia				
	Ligeira	0	1	0
Infiltrado, células mistas				
	Ligeiro	0	0	1
<u>Artéria</u> <u>coronária</u> Necrose com inflamação				
	Ligeira	0	0	1
<u>Raiz aórtica</u> Hemorragia				
	Mínima	0	1	0
Infiltrado, células mistas				
	Mínimo	0	1	0

[543] Como mostrado na Tabela 13 e na FIG. 22, animais administrados com ≥ 3 mg/kg do pan-anticorpo de TGF β exibiram achados nas válvulas cardíacas (ou seja, valvulopatia) similares àqueles descritos nos animais administrados com LY2109761, como descrito acima (veja também a FIG. 17F, painel esquerdo inferior). Animais administrados com ≥ 30 mg/kg do pan-anticorpo de TGF β exibiram achados no átrio similares àqueles descritos em animais administrados com LY2109761. Animais administrados com 100 mg/kg do pan-anticorpo de TGF β exibiram achados no miocárdio similares àqueles descritos em animais administrados com LY2109761, e animais administrados com 30 mg/kg de pan-anticorpo de TGF β tinham hemorragia no miocárdio. Um animal administrado com 100 mg/kg do pan-anticorpo de TGF β teve necrose intramural moderada com hemorragia em uma artéria coronária, que estava

associada com ligeiros infiltrados perivasculares de células inflamatórias mistas. Achados ósseos em animais administrados com o pan-anticorpo de TGF β e LY2109761 consistiam em esterno macroscópico de forma anormal e espessura microscópica aumentada da zona hipertrófica na placa terminal do esterno e epífise do fêmur e tíbia; esses achados eram de incidência e/ou gravidade maior em animais administrados com LY2109761, comparados com pan-anticorpo de TGF β .

Tabela 13. Achados microscópicos no coração em animais que recebem o pan-anticorpo de TGF β .

		Pan-anticorpo de TGF β			
Nível de dose (mg/kg/dia)		0	3	30	100
Coração					
<u>Válvulas cardíacas</u> Valvulopatia					
	Mínima	0	2	0	0
	Ligeira	0	2	4	5
	Moderada	0	0	1	0
Átrio Infiltrado, células mistas					
	Mínimo	0	0	1	2
	Ligeiro	0	0	1	1
Hiperplasia, endotélio					
	Mínima	0	0	3	1
Hemorragia					
	Mínima	0	0	1	0
<u>Miocárdio</u> Degeneração/ necrose					
	Ligeira	0	0	0	2
Hemorragia					
	Mínima	0	0	2	1
	Ligeira	0	0	1	1
Infiltrado, células mistas, base					
	Ligeiro	0	0	0	1
<u>Artéria coronária</u> Necrose com hemorragia					
	Moderada	0	0	0	1

Infiltrado, células mistas, perivascular					
	Ligeiro	0	0	0	1

[544] Embora tenham ocorrido achados mínimos ou ligeiros nas válvulas do coração em um pequeno número de animais que receberam a administração de Ab2, esses achados foram considerados improvavelmente relacionados ao artigo de teste em função da baixa incidência (animal e número de válvulas do coração dentro de um animal), da ausência de uma dose-resposta e/ou ausência de achados ósseos concomitantes.

B. Fase II do estudo

[545] Em uma segunda fase do estudo, fêmeas de ratos foram designadas a grupos e receberam a administração de Ab2 a 3 mg/kg (1 grupo, n = 5), a 30 mg/kg (1 grupo, n = 5), ou a 100 mg/kg (1 grupo, n = 5); Ab3 a 3 mg/kg (1 grupo, n = 5), 30 mg/kg (1 grupo, n = 5), 100 mg/kg (1 grupo, n = 5) ou 60 mg/kg (1 grupo, n = 5); LY2109761 a 200 mg/kg (1 grupo, n = 5); ou PBS (pH 7,4) (1 grupo, n = 5), como discutido acima. Os animais que recebem Ab2, Ab3 ou o controle de veículo foram dosados por via intravenosa uma vez por semana por 4 semanas em um volume de 10 ml/kg, e os ratos que recebem LY2109761 foram dosados por gavagem oral uma vez por dia por cinco dias. Os animais foram sacrificados e necropsias realizadas.

[546] Similares às observações na primeira fase do estudo, os achados no coração relacionados ao artigo de teste ocorreram por uma duração mais curta (ou seja, 5 dias ao invés de 7 dias) em animais administrados com 200 mg/kg de LY2109761. Os achados microscópicos no coração foram associados com pesos do coração aumentados para animais administrados com 200 mg/kg de LY2109761 ou ≥ 3 mg/kg de

pan-anticorpo de TGF β .

[547] Embora tenham ocorrido achados ocorrido mínimos ou ligeiros nas válvulas do coração em um pequeno número de animais da Fase II administrados com Ab2 ou Ab3, não era provável que esses achados fossem considerados relacionados ao artigo de teste em função da baixa incidência (animal e número de válvulas do coração dentro de um animal), ausência de uma dose resposta, e/ou ausência de achados ósseos concomitantes.

[548] Outros tecidos foram avaliados na Fase II; nenhum achado microscópico foi atribuído ao Ab2 ou Ab3. No entanto, achados microscópicos ocorreram nos ossos (esterno, fêmur e tíbia), fígado, pâncreas (artéria), timo, tireóide, tecidos reprodutivos femininos (ovário, útero, cérvix e vagina), e glândula mamária de animais da Fase II administrados com 200 mg/kg de LY2109761. Os achados no timo consistiram em linfócitos minimamente a ligeiramente diminuídos no córtex, que se correlacionavam com timo macroscopicamente pequeno e pesos do timo diminuídos. Os linfócitos diminuídos no timo eram consistentes com um efeito primário do artigo de teste ou eram efeitos secundários ao estresse (ou seja, glicocorticóides endógenos aumentados). Hipertrofia mínima da célula folicular da tireóide, que se correlacionava com pesos da tireóide aumentados, e era consistente com indução de enzimas hepáticas, o que resultou em metabolismo aumentado de tiroxina. Pesos aumentados do fígado para animais administrados com LY2109761 eram sugestivos de indução de enzimas hepáticas, mas não tinham uma correspondência microscópica. Os achados microscópicos nos tecidos reprodutivos femininos e na glândula mamária eram

consistentes com ciclo de estro diminuído e foram correlacionados com pesos diminuídos do útero. Alguns animais também tinham achados na glândula mamária caracterizados por hiperplasia/hipertrofia lobular das células epiteliais alveolares e/ou ductais (ou seja, masculinização), o que era consistente com estrogênio diminuído.

C. Conclusão do estudo

[549] Em resumo, animais tratados com Ab2 e Ab3 em todas as doses testadas (3 mg/kg, 30 mg/kg ou 100 mg/kg) ao longo de um período de 4 semanas não exibiram efeitos tóxicos em relação ao nível de base nos seguintes parâmetros: degeneração ou necrose miocárdio, hemorragia do átrio, hemorragia do miocárdio, hemorragia das válvulas, hiperplasia do endotélio das válvulas, hiperplasia do estroma das válvulas, infiltrados mistos de células inflamatórias de nas válvulas do coração, mineralização, necrose com hemorragia na artéria coronária, necrose com inflamação na raiz aórtica, necrose ou infiltrado de células inflamatórias em cardiomiócitos e valvulopatia. Dessa forma, o tratamento com inibidores da ativação de TGF β 1 isoforma-específicos resultou surpreendentemente em perfis de segurança significativamente aprimorados, por exemplo, mortalidade reduzida e cardiotoxicidade reduzida, comparado com tratamento com pan-inibidor de TGF β (por exemplo, o inibidor de ALK5 quinase LY2109761 ou o pan-anticorpo de TGF β).

Exemplo 20: Seletividade de isoforma de Ab3 *in vivo*

[550] Para confirmar a inibição isoforma-seletiva de TGF β 1 *in vivo*, foi feito um estudo de farmacodinâmica no

qual os efeitos de Ab3 nos níveis tônicos de fosfo-SMAD2/3 foram avaliados em células de lavagem broncoalveolar (BAL) coletadas de ratos saudáveis. É relatado na literatura que sob condições homeostáticas, células de BAL expressam predominantemente TGF β 2/3, mas pouco TGF β 1, enquanto o último se torna preferencialmente elevado em condições patológicas.

[551] Ratos Sprague-Dawley saudáveis (aproximadamente 6-8 semanas de idade, pesando 200-250 g no começo do estudo; Charles River) foram randomizados por peso corporal em grupos de estudo e dosados como descrito abaixo.

[552] Os animais receberam anticorpos de teste (huNEG-mIgG1, anticorpo anti-integrina β 6, ou Ab3) nos Dias 1, 8 e 15 por injeção intraperitoneal. Os animais são sacrificados no Dia 16 para coleta de BAL e de soro. Um grupo de animais de controle foi dosado com uma dose única por gavagem oral (PO) de LY2109761 (inibidor de ALK5 de pequena molécula) a 100 mg/kg e foi sacrificado em 2 horas (+/- 20 min) pós-dosagem para coletas de BAL.

[553] Para coletar as amostras de BAL, o pulmão inteiro era lavado três vezes com 5,0 ml de solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco gelada. As lavagens foram reunidas em pool e imediatamente colocadas em gelo úmido até processadas da seguinte forma: uma pequena porção (100-150 μ l) de cada amostra foi colocada de lado em gelo para contagens de células. As amostras restantes foram centrifugadas a 1.300 g (2-8°C) por \geq 10 minutos. Os péletes de células foram imediatamente colocados em gelo. 250 μ l do tampão de lise pSMAD gelado recém preparado foram usados para a lise dos péletes. As amostras lisadas foram

centrifugadas a 14.000 g por 10 minutos (2-8°C). O sobrenadante resultante foi dividido em alíquotas e imediatamente congelado subitamente nitrogênio líquido ou em gelo seco.

[554] As amostras de soro foram processadas por centrifugação a 2.500 g, 2-8°C, por 10 minutos. As amostras de soro foram congeladas -70 até -90°C.

[555] Ensaio de fosfo-SMAD2/3 foram realizados por ELISA (Cell Signaling Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram avaliados por proporções de SMAD2/3 fosforilado-para-total. Como mostrado na FIG. 20, a sinalização tônica de SMAD2/3 era significativamente suprimida em animais tratados com o pan-inibidor de TGF β de pequena molécula, LY2109761, ou com o anticorpo monoclonal comum contra a cadeia β 6 de integrina, que bloqueia a ativação de TGF β 1/3 mediada por integrina. Por comparação, animais tratados com o Anticorpo de TGF β 1 isoforma-específico, Ab3, mantiveram os níveis tônicos de fosforilação em células de BAL, dando suporte à noção de que Ab3 é capaz de inibir seletivamente a ativação de TGF β 1, sem perturbar a função homeostática de TGF β 2 ou TGF β 3 *in vivo*.

Exemplo 21: Ab3: Um novo e altamente específico anticorpo de inibição de TGF β 1 com atividade antifibrótica

[556] O fator de transformação de crescimento- β 1 (TGF β 1) possui funções biológicas diversas, incluindo regulação de respostas imunes e homeostasia tecidual. A ativação desregulada de TGF β 1 foi associada a diversas doenças, incluindo fibrose renal, nas quais a ativação crônica é um condutor crucial da doença. No entanto, por causa da alta homologia entre o fator de crescimento TGF β 1 e seus parentes

próximos TGF β 2 e TGF β 3, inibidores de TGF β 1 realmente específicos permaneceram enganosos. A pan-inibição de TGF β , por outro lado, pode causar valvulopatias cardíacas dose-limitantes, levando a preocupações de toxicidade com dosagem de longo prazo. TGF β s são expressos como pró-proteínas que são clivadas proteoliticamente em um pró-domínio do terminal-N e um fator de crescimento do terminal-C. O pró-domínio permanece associado não covalentemente ao fator de crescimento, evitando a ligação ao receptor. Esse complexo de TGF β latente reside em células ou na matriz extracelular até que o complexo seja ativado por integrinas, liberando o fator de crescimento e permitindo a ligação ao receptor. Para identificar anticorpos TGF β 1-específicos, o pró-domínio, que compartilha homologia bem menor para TGF β 2 e TGF β 3 do que o fator de crescimento, foi visado. Um anticorpo monoclonal Ab3 que se liga especificamente ao TGF β 1 latente, sem ligação detectável ao TGF β 2 ou TGF β 3 latente, foi identificado. Ab3 demonstrou que bloqueia a ativação de TGF β 1 latente por integrinas α V β 6 ou α V β 8, fornecendo especificidade não obtida produtos biológicos que visam a interação fator de crescimento/receptor de TGF β 1. Ab3 se liga e inibe TGF β 1 latente em complexo com todas as quatro moléculas apresentadoras de TGF β conhecidas, permitindo direcionamento a TGF β 1 latente em vários tecidos. Ab3 bloqueia a ativação de TGF β 1 endógeno em diversas células primárias, incluindo miofibroblastos dérmicos e células estreladas hepáticas. Finalmente, a eficácia *in vivo* da inibição de TGF β 1 por meio desse novo mecanismo foi testada no modelo de fibrose renal por UUO, mostrando que Ab3 suprime marcadores de fibrose a níveis similares àqueles obtidos em

animais tratados com pan-anticorpo de TGF β . Considerados em conjunto, esses dados demonstram que a inibição da ativação de TGF β 1 latente é eficaz em um modelo clínico de fibrose e possui um perfil de segurança superior comparada com a pan-inibição de TGF β .

Exemplo 22: Inibição altamente específica da ativação de TGF β 1 por Ab1, um anticorpo que possui atividade antifibrótica

[557] O fator de transformação de crescimento- β 1 (TGF β 1) é uma citocina com funções biológicas cruciais e diversas, incluindo regulação de respostas imunes e homeostasia tecidual. TGF β s são expressos como pró-proteínas que são clivadas proteoliticamente em um pró-domínio do terminal-N e um fator de crescimento do terminal-C. O fator de crescimento secretado permanece associado não covalentemente ao pró-domínio, evitando a ligação ao receptor e sinalização. TGF β 1 latente está associado covalentemente com moléculas apresentadoras por meio de ligações dissulfeto que ligam TGF β 1 latente à matriz extracelular ou à superfície da célula. Até hoje, quatro moléculas apresentadoras de TGF β (LTBP1, LTBP3, GARP e LRRC33) foram identificadas. Essas moléculas apresentadoras desempenham um papel crucial na ativação do complexo latente, na medida em que fornecem uma âncora para que as integrinas exerçam força de tração sobre TGF β 1 latente liberando, dessa forma, o fator de crescimento ativo. A ativação desregulada de TGF β 1 foi associada a diversas patologias, incluindo doenças fibróticas, nas quais a ativação crônica de TGF β 1 dirige a transdiferenciação de miofibroblasto e superexpressão de proteínas da matriz extracelular. O papel de TGF β 1 na direção da fibrose levou

ao desenvolvimento de vários produtos terapêuticos para inibir sua atividade. No entanto, verificou-se que a inibição com pan-anticorpos anti-TGF β potentes causa valvulopatias cardíacas dose-limitantes, levando a preocupações sobre a toxicidade dessa abordagem terapêutica. A estratégia alternativa de visar especificamente TGF β 1 é complicada pela alta homologia entre o fator de crescimento TGF β 1 e seus parentes próximos TGF β 2 e TGF β 3. O pró-domínio de TGF β 1, que possui homologia bem menor para os pró-domínios de TGF β 2 e TGF β 3, foi visado e Ab3, um anticorpo monoclonal totalmente humano que se liga especificamente e inibe a ativação de TGF β 1 latente sem ligação detectável ao TGF β 2 ou TGF β 3 latente, foi identificado. Esse novo mecanismo permite especificidade de isoforma não obtida por produtos biológicos que se ligam e bloqueiam a interação fator de crescimento/receptor de TGF β 1 e evita a ativação de TGF β 1 latente por integrinas tanto α V β 6 quanto α V β 8. Ab3 se liga e inibe TGF β 1 latente em complexo com todas as quatro moléculas apresentadoras de TGF β conhecidas, permitindo o direcionamento a TGF β 1 latente em vários tecidos. Ab3 inibe TGF β 1 endógeno em diversas células primárias *in vitro*, incluindo miofibroblastos dérmicos e células estreladas hepáticas. Além disso, a eficácia *in vivo* da inibição de TGF β 1 por meio desse novo mecanismo foi testada no modelo de fibrose renal por obstrução ureteral unilateral. Foi verificado que Ab3 suprime a indução de genes pró-fibróticos a níveis similares àqueles obtidos em animais tratados com pan-anticorpo de TGF β . Considerados em conjunto, esses dados demonstram que a inibição da ativação de TGF β 1 latente é eficaz em um modelo clínico de fibrose e possui perfil de

segurança potencialmente superior, comparada com pan-inibição de TGF β .

Exemplo 23: Análise por bioinformática de expressões relativas de TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3

[558] Para avaliar a expressão de isoformas de TGF β em tumores cancerosos, foram examinados dados de expressão gênica (RNAseq) de conjuntos de dados disponíveis publicamente. Usando uma ferramenta de interface *online* disponível publicamente (Firebrowse) para examinar a expressão de isoformas de TGF β no "Cancer Genome Atlas" (TCGA), primeiro foi examinada a expressão diferencial de RNA que codifica isoformas de TGF β em tecido tanto normal quanto canceroso. Todos os conjuntos de dados tumorais de RNAseq na base de dados do TCGA para os quais havia comparadores com tecido normal foram selecionados, e a expressão dos genes de TGFB1, TGFB2 e TGFB3 foi examinada (FIG. 21A). Dados da interface Firebrowse estão representados como log2 de leituras por milhão de quilobases (RPKM).

[559] Esses dados sugerem que, na maioria dos tipos de tumor (cinza), TGFB1 é o transcrito mais abundantemente expresso das isoformas de TGF β , com valores de log2 (RPKM) geralmente na faixa de 4-6, vs. 0-2 para TGFB2 e 2-4 para TGFB3. Também observamos que, em vários tipos de tumor, o nível médio da expressão tanto de TGFB1 quanto de TGFB3 são elevados em relação a amostras normais comparadoras (preto), sugerindo que a expressão aumentada dessas isoformas de TGF β pode estar associada com células cancerosas. Por causa do papel potencial da sinalização de TGF β na supressão do sistema imune do hospedeiro no microambiente de câncer,

estávamos interessados em observar que transcritos de *TGFB1* estavam elevados em tipos de câncer para os quais terapias anti-PD1 ou anti-PDL1 são aprovadas - essas indicações estão rotuladas em cinza na FIG. 21A.

[560] Observe que, enquanto $RPKM > 1$ é geralmente considerado como sendo o valor mínimo associado com expressão gênica biologicamente relevante (Hebenstreit e cols., 2011; Wagner e cols., 2013), no entanto, para análises subsequentes, foram usados valores de corte de RPKM mais rigorosos (ou da medição calculada de FPKM (veja Conesa e cols., 2016)) > 10 ou > 30 para evitar falso-positivos. Para comparação, todos os três daqueles limiares estão indicados na FIG. 21A.

[561] As grandes faixas interquartis na FIG. 21A indicam variabilidade significativa na expressão de isoforma de *TGFβ* entre pacientes individuais. Para identificar cânceres nos quais pelo menos um subconjunto da população de pacientes possui tumores que expressam diferencialmente a isoforma *TGFB1*, foram analisados dados de RNAseq de amostras de tumor individuais no conjunto de dados de TCGA, calculando o número de fragmentos por milhão de quilobases (FPKM). RPKM e FPKM são aproximadamente equivalentes, embora FPKM corrija leituras de contagem duplas em extremidades opostas do mesmo transcrito (Conesa e cols., 2016). Amostras de tumor foram pontuadas como positivas para expressão de *TGFB1*, *TGFB2* ou *TGFB3* se o valor FPKM do transcrito fosse >30 e a fração de pacientes (expressa como %) de cada tipo de câncer que expressava cada isoforma de *TGFβ* foi calculada (FIG. 21B).

[562] Como mostrado na FIG. 21B, a maioria dos tipos de tumor no conjunto de dados de TCGA mostra uma percentagem

significante de amostras individuais que são TGFB1-positivas, com alguns tipos de câncer, incluindo leucemia mielóide aguda, linfoma de célula B grande difuso e carcinoma de célula escamosa da cabeça e pescoço, expressando TGFB1 em mais do que 80% de todas as amostras de tumor. Consistente com os dados na FIG. 21A, menos tipos de câncer são positivos para TGFB2 ou TGFB3, embora vários cânceres exibam uma percentagem igual ou maior de amostras de tumor que são TGFB3-positivas, incluindo carcinoma invasivo de mama, mesotelioma e sarcoma. Esses dados sugerem que os tipos de câncer podem ser estratificados para expressão de isoforma de TGF β , e que essa estratificação pode ser útil na identificação de pacientes que são candidatos para tratamento com inibidores de isoforma de TGF β -específicos.

[563] Para investigar ainda mais hipótese, os dados de RNAseq de log2 (FPKM) de um subconjunto de amostras de tumor individuais foram tabulados em um mapa de calor (FIG. 21C), que configura o limiar de cor para refletir FPKM > 30 como um nível de transcrito mínimo para ser pontuado como TGFB isoforma-positivo.

[564] Cada amostra é representada como uma fileira única no mapa de calor, e as amostras estão dispostas por nível de expressão de TGFB1 (os maiores níveis de expressão no topo). Consistente com a análise na FIG. 21B, um número significativo de amostras em cada tipo de câncer é positivo para expressão de TGFB1. No entanto, essa representação também ressalta o fato de que muitos tumores expressam exclusivamente transcritos de TGFB1, particularmente nos tipos de câncer de carcinoma esofágico, urotelial da bexiga, adenocarcinoma pulmonar e melanoma cutâneo. Curiosamente, esse desvio para

TGFB1 não é uma característica de todos os cânceres, já que amostras de carcinoma de mama invasivo mostram um número de amostras bem maior que são TGFB3-positivas do que são TGFB1-positivas. No entanto, essa análise indica que a isoforma $\beta 1$ é o predominante e, na maioria dos casos, o único, membro da família TGF β presente em tumores de um grande número de pacientes com câncer. Considerados em conjunto com dados que sugerem que a sinalização de TGF β tem um papel significativo na imunossupressão no microambiente de câncer, esses achados também apontam para a utilidade da inibição TGF $\beta 1$ -específica no tratamento desses tumores.

[565] Para identificar modelos em camundongo nos quais pode ser testada a eficácia da inibição TGF $\beta 1$ -específica como uma terapêutica para o câncer, foi analisada a expressão da isoforma de TGF β em dados de RNAseq de várias linhagens de células usadas em modelos singênicos de tumor em camundongos. Para essa análise, duas representações dos dados foram geradas. Primeiro, similar aos dados na Figura 3, geramos um mapa de calor dos valores de \log_2 (FPKM) para tumores derivados de cada linhagem de célula (FIG. 21D, esquerda). Como essa análise foi usada para identificar modelos singênicos que expressam TGFB1 elevado que são TGFB2- e TGFB3-negativos, nos preocupamos primariamente em evitar falso-negativos, e configuramos nosso limiar "positivo" para FPKM > 1, bem abaixo daquele nas representações nas FIGS. 21B e 21C.

[566] Como os dados representação na FIG. 21D (esquerda) deixam claro, diversos tumores singênicos, incluindo MC-38, 4T-1, e EMT6, comumente expressam níveis significantes tanto de TGF $\beta 1$ quanto de TGF $\beta 3$. Em contraste, os modelos A20 e EL4

expressam TGF β 1 quase exclusivamente, e os tumores S91 e P815 exibem uma forte tendência para expressão de TGFB1.

[567] Para avaliar ainda mais a expressão diferencial de TGFB1 vs. TGFB2 e/ou TGFB3, o $\min\Delta\text{TGFB1}$ foi calculado, definido como o menor valor de $\log_2(\text{FPKM}_{\text{TGFB1}}) - \log_2(\text{FPKM}_{\text{TGFB2}})$ ou $\log_2(\text{FPKM}_{\text{TGFB1}}) - \log_2(\text{FPKM}_{\text{TGFB3}})$. O $\min\Delta\text{TGFB1}$ para cada modelo é mostrado como um mapa de calor na FIG. 21D (direita), e enfatiza a conclusão da FIG. 21D (esquerda) de que tumores singênicos das linhagens de células A20, EL4, S91 e/ou P815 podem representar modelos excelentes nos quais se testa a eficácia de inibidores TGF β 1-específicos.

[568] As várias características e modalidades da presente invenção referidas em seções individuais acima se aplicam, como apropriado, a outras seções, *mutatis mutandis*. Consequentemente, características especificadas em uma seção podem ser combinadas com características especificadas em outras seções, como apropriado.

[569] Aqueles habilitados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de verificar usando apenas experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção descritas nesse relatório descritivo. Esses equivalentes visam ser englobados pelas reivindicações seguintes.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para uso em um método para o tratamento de uma doença associada com desregulação de TGF β 1 em um indivíduo humano,

caracterizada pelo fato de que a composição compreende um inibidor isoforma-específico de TGF β 1 e um excipiente farmacologicamente aceitável,

em que o inibidor visa tanto TGF β 1 associado à ECM quanto TGF β 1 associado à célula imune, mas não visa TGF β 2 ou TGF β 3 *in vivo*, em que, opcionalmente, o inibidor inibe a etapa de ativação de TGF β 1; e,

em que a doença é representada por desregulação ou deficiência de pelo menos dois dos seguintes atributos:

- a) células T regulatórias (Treg);
- b) proliferação ou função de célula T efetora (Teff);
- c) proliferação ou diferenciação de células mielóides;
- d) recrutamento ou diferenciação de monócitos;
- e) função de macrófago;

f) transição de epitelial-para-mesenquimal (EMT) e/ou transição de endotelial-para-mesenquimal (EndMT);

g) expressão gênica em um ou mais de genes marcadores selecionados do grupo que consiste em: PAI-1, ACTA2, CCL2, Colla1, Col3a1, FN-1, CTGF e TGF β 1;

- h) componentes ou função da ECM;
- i) diferenciação de fibroblasto; e,

em que o método compreende a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz da composição ao indivíduo humano diagnosticado com a doença.

2. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o TGF β 1 associado à ECM é

TGF β 1 apresentado por LTBP1 e/ou TGF β 1 apresentado por LTBP3; e, em que o TGF β 1 associado à célula imune é TGF β 1 apresentado por GARP e/ou TGF β 1 apresentado por LRRC33.

3. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o indivíduo humano sofre de uma doença que envolve um componente proliferativo e/ou um componente fibrótico.

4. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que a doença é um câncer, em que, opcionalmente, o câncer é um câncer metastático.

5. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o câncer compreende um tumor sólido que é TGF β 1-positivo, em que, opcionalmente, o tumor sólido é um tumor desmoplásico.

6. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o câncer é um distúrbio mieloproliferativo, em que, opcionalmente, o distúrbio mieloproliferativo é trombocitemia essencial (ET), policitemia vera (PV) ou mielofibrose primária (PMF).

7. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o câncer está associado com um número aumentado de Tregs, TAMs, TANS, MDSCs, CAFs, ou quaisquer combinações destas.

8. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o câncer é pouco responsivo a uma terapia de câncer selecionada do grupo que consiste em: radioterapia, quimioterapia e terapia com inibidor de *checkpoint*, em que a terapia com inibidor de *checkpoint* opcionalmente compreende um antagonista de PD-1, antagonista de PD-L1 ou antagonista de CTLA-4; em que, ainda

opcionalmente, a resposta pobre é causada por resistência intrínseca ou resistência adquirida.

9. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o indivíduo possui um câncer resistente a um inibidor de *checkpoint* imune selecionado do grupo que consiste em:

mielofibrose, melanoma, carcinoma de célula renal, câncer da bexiga, câncer do cólon, malignidades hematológicas, carcinoma de célula não-pequena, câncer de pulmão de célula não-pequena (NSCLC), linfoma (de Hodgkin clássico e não-Hodgkin), câncer da cabeça e pescoço, câncer urotelial, câncer com instabilidade microssatélite elevada, câncer deficiente no reparo de erro de pareamento, câncer gástrico, câncer renal e câncer hepatocelular.

10. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que uma amostra clínica do indivíduo humano exibe expressão de GARP e/ou LRRC33; e/ou, em que a expressão de TGF β 1 na amostra clínica é maior do que a expressão de TGF β 2 ou TGF β 3, em que, opcionalmente, a expressão é determinada por níveis de RNA e/ou níveis de proteína.

11. Composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 10, caracterizada pelo fato de que a quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade eficaz para obter um ou mais dos seguintes efeitos clínicos:

- a) crescimento tumoral reduzido;
- b) metástase reduzida;
- c) invasão tumoral reduzida;
- d) angiogênese e vascularização/vascularidade reduzidas;

- e) recrutamento reduzido de monócitos para um local de tumor;
- f) infiltração de TAM reduzida do tumor;
- g) ativação reduzida de macrófagos;
- h) proporções aumentadas de populações de macrófagos M1 para M2 (TAM-like) em um local de tumor;
- i) número reduzido de CAFs em um local de tumor;
- j) imunossupressão reduzida;
- k) responsividade aumentada a uma terapia de câncer;
- l) sobrevida prolongada;
- m) período refratário prolongado;
- n) taxas aumentadas de remissão completa ou respostas completas;
- o) proporções diminuídas de células Treg/Teff em um local de tumor;
- p) número aumentado de células Teff em um local de tumor;
- q) número reduzido de células Treg em um local de tumor;
- r) número reduzido de MDSCs e/ou TANs no indivíduo; e, em que o efeito clínico (ou efeitos clínicos) é obtido com um nível aceitável de toxicidades no indivíduo.

12. Composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4, 6, 8 a 10, caracterizada pelo fato de que a quantidade terapêuticamente eficaz é uma quantidade eficaz para obter pelo menos dois dos seguintes benefícios clínicos:

- a) fibrose reduzida em uma medula óssea;
- b) hematopoiese aumentada de células sanguíneas diferenciadas em uma medula óssea;
- c) proliferação reduzida de células-tronco anormais na medula óssea, em que, opcionalmente, a células-tronco

anormais são CD133-positivas;

d) megacariócitos reduzidos em uma medula óssea e/ou baço;

e) ocorrência e/ou extensão reduzida de hematopoiese extramedular no indivíduo, em que, opcionalmente, a hematopoiese extramedular é no baço;

f) necessidade reduzida de transplante de medula óssea;

g) sobrevida prolongada;

h) níveis normalizados de um ou mais de marcadores de expressão, em que o marcador de expressão opcionalmente é selecionado do grupo que consiste em BMP1, BMP6, BMP7 e receptor de BMP 2, PLOD2, TGF β 1, bFGF, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), Col1, metaloproteinases, FN1, CXCL12, VEGF, CXCR4, IL-2, IL-3, IL-9, CXCL1, IL-5, IL-12, TNF α , Bmp2, Bmp5, Acvr11, Tgfb1l1, Igf1, Cdkn1a, Ltbp1, Gdf2, Lefty1 e Nodal; e,

i) inflamação crônica reduzida na medula óssea.

13. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o indivíduo humano possui uma fibrose de órgão, em que, opcionalmente, a fibrose de órgão é fibrose hepática, fibrose pulmonar, fibrose renal, fibrose cutânea e/ou fibrose cardíaca.

14. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o indivíduo possui uma fibrose de órgão e não é um candidato para transplante de órgão.

15. Composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3, 13 e 14, caracterizada pelo fato de que o indivíduo possui um distúrbio fibrótico com inflamação crônica.

16. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o distúrbio fibrótico é uma distrofia muscular, em que, opcionalmente, a distrofia muscular é DMD.

17. Composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o inibidor isoforma-seletivo inibe três ou mais das seguintes atividades de TGF β 1:

- a) atividade de TGF β 1 mediada por GARP;
- b) atividade de TGF β 1 mediada por LRRC33;
- c) atividade de TGF β 1 mediada por LTBP1, e
- d) atividade de TGF β 1 mediada por LTBP3;

em que, opcionalmente, o inibidor inibe todas as atividades de TGF β 1 (a)-(d).

18. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o inibidor é um anticorpo monoclonal ou fragmento deste.

19. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que o anticorpo monoclonal ou fragmento deste se liga a um complexo de proteína que compreende um TGF β 1 pró/latente, em que, opcionalmente, o complexo de proteína ainda compreende uma molécula apresentadora selecionada do grupo que consiste em: LTBP1, LTBP3, GARP e LRRC33.

20. Composição, de acordo com a reivindicação 18 ou 19, caracterizada pelo fato de que o anticorpo ou fragmento deste se liga especificamente a um epítipo dentro de TGF β 1 pró/latente, em que, opcionalmente, o epítipo está dentro de um pró-domínio do TGF β 1 pró/latente.

21. Composição, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 18 a 20, caracterizada pelo fato de que o anticorpo ou fragmento deste se liga especificamente a um epitopo combinatório e/ou um epitopo conformacional.

22. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 21, caracterizada pelo fato de que o anticorpo monoclonal inibe a liberação de fator de crescimento TGF β 1 maduro por um complexo de proteína latente que compreende TGF β 1 pró/latente.

23. Composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 22, caracterizada pelo fato de que o anticorpo ou o fragmento deste é um anticorpo totalmente humano ou humanizado.

24. Composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 23, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo IgG₄ humano, em que, opcionalmente, o anticorpo IgG₄ humano compreende uma substituição do arcabouço.

25. Composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 24, caracterizada pelo fato de que o anticorpo possui as seguintes sequências de CDR, opcionalmente com três ou menos substituições:

CDR-H1: NYAMS (ID. DE SEQ. N°: 85);

CDR-H2: SISGSGGATYYADSVKG (ID. DE SEQ. N°: 86);

CDR-H3: ARVSSGHWDFDY (ID. DE SEQ. N°: 87);

CDR-L1: RASQSISSYLN (ID. DE SEQ. N°: 88);

CDR-L2: SSLQS (ID. DE SEQ. N°: 89); e,

CDR-L3: QQSYSAPFT (ID. DE SEQ. N°: 90).

26. Composição farmacêutica, caracterizada por compreender um anticorpo que compreende um polipeptídeo da região variável da cadeia pesada que é pelo menos 90%

idêntico a uma sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 95, e um polipeptídeo da região variável da cadeia leve que é pelo menos 90% idêntico a uma sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N°: 97.

27. Composição farmacêutica, caracterizada por compreender um anticorpo que possui as seguintes sequências de CDR, opcionalmente com três ou menos substituições:

CDR-H1: NYAMS (ID. DE SEQ. N°: 85);

CDR-H2: SISGSGGATYYADSVKG (ID. DE SEQ. N°: 86);

CDR-H3: ARVSSGHWDFDY (ID. DE SEQ. N°: 87);

CDR-L1: RASQSISSYLN (ID. DE SEQ. N°: 88);

CDR-L2: SSLQS (ID. DE SEQ. N°: 89); e,

CDR-L3: QQSYSAPFT (ID. DE SEQ. N°: 90).

28. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que o anticorpo possui as sequências de CDR sem substituições.

FIG. 1

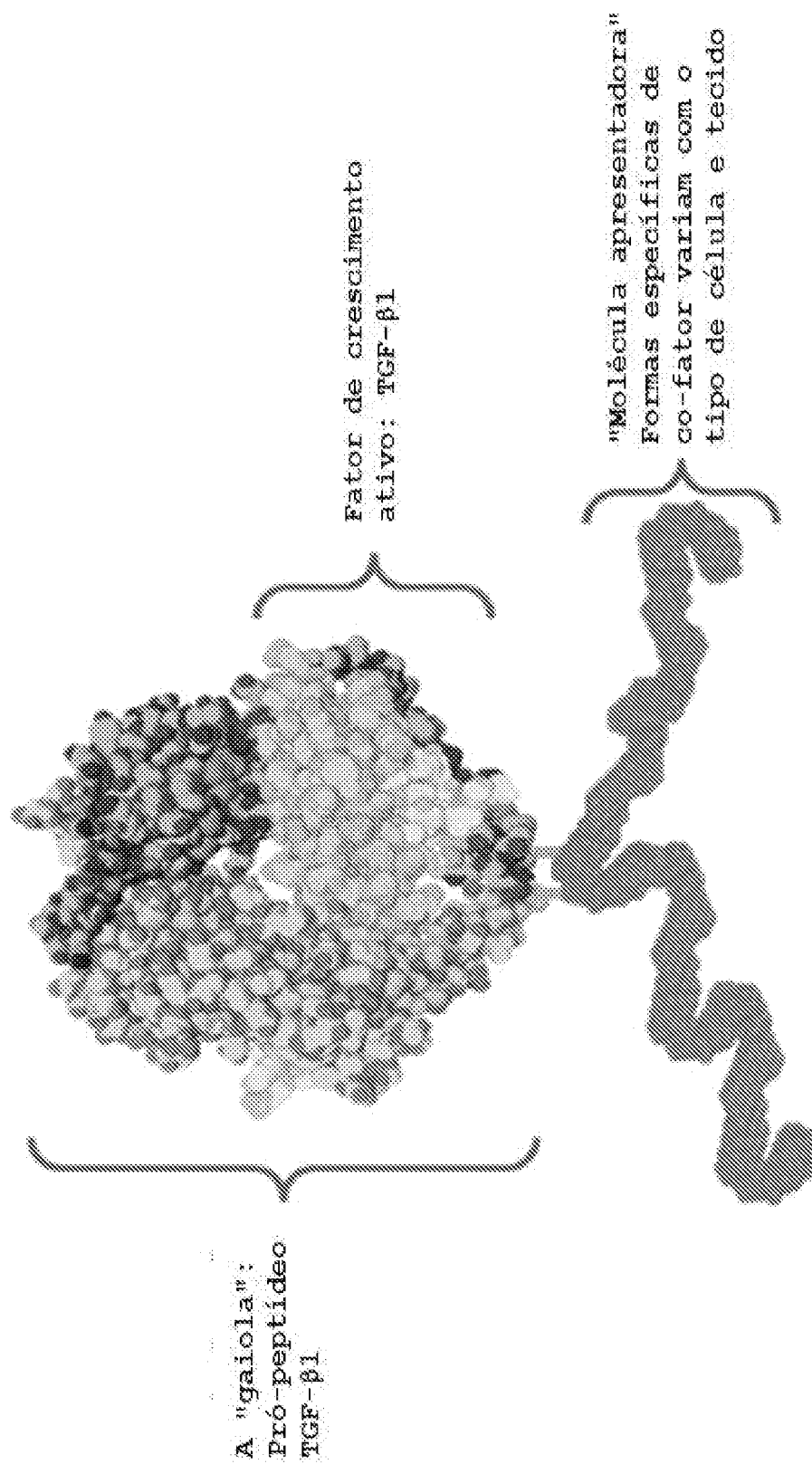


FIG. 2A

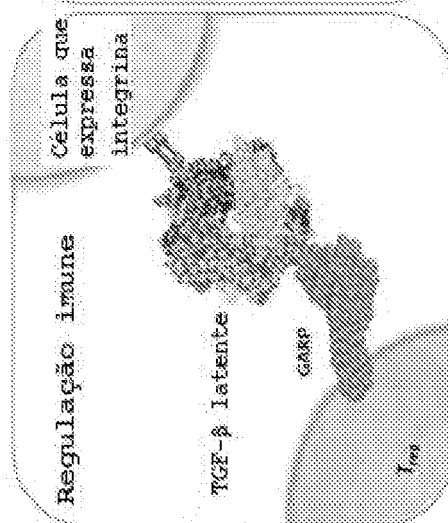


FIG. 2B

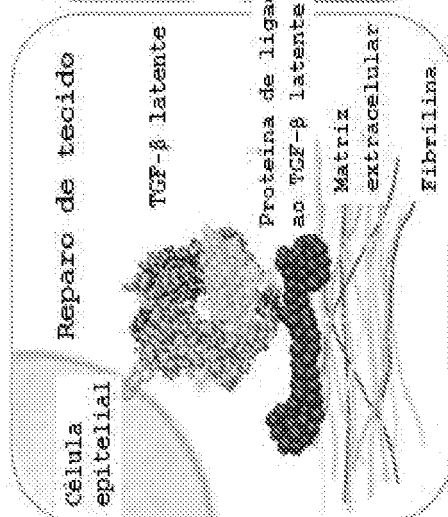


FIG. 2C

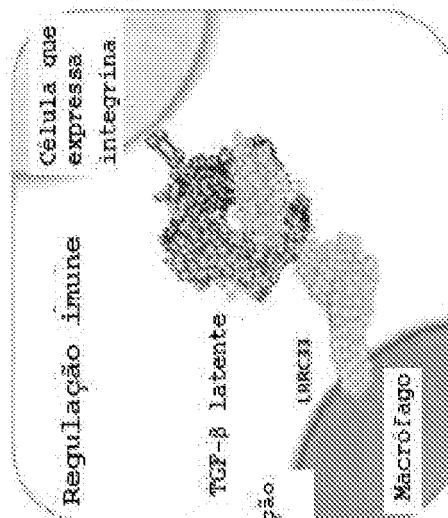


FIG. 3

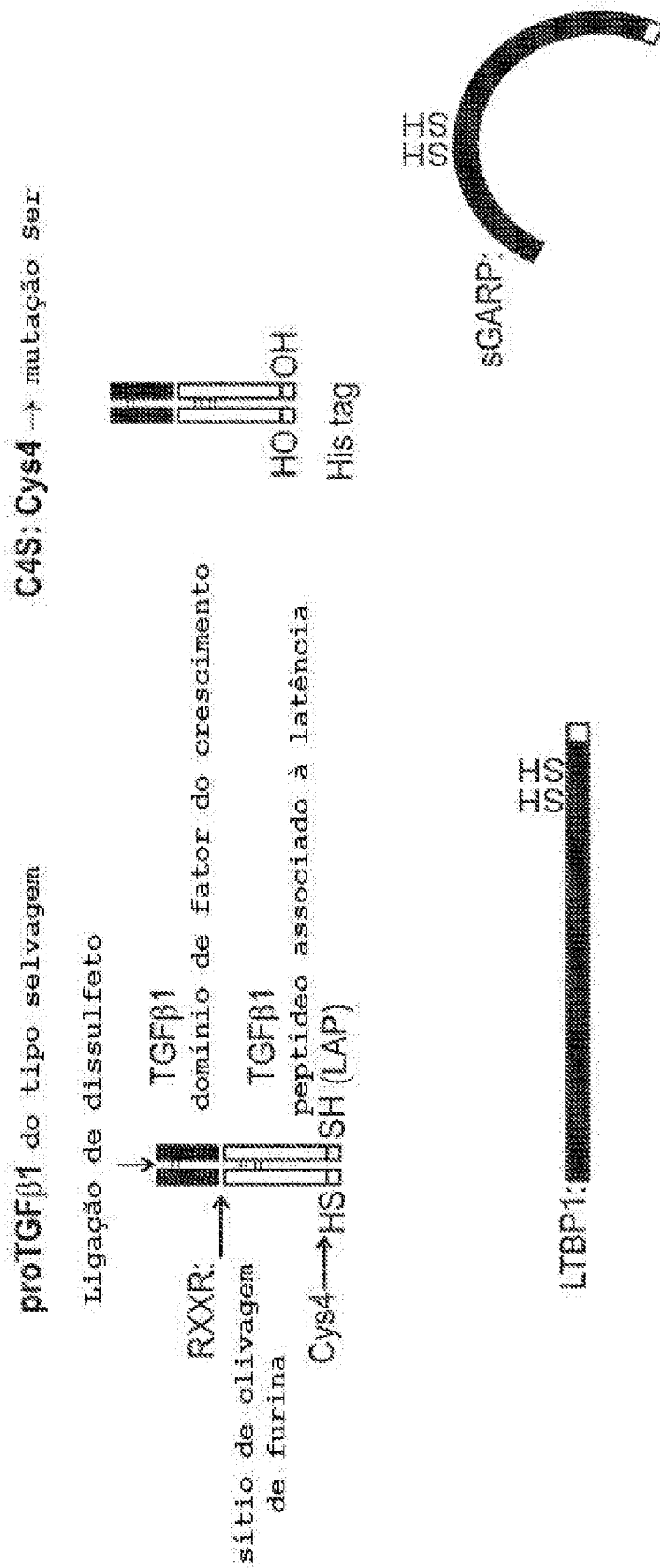


FIG. 4A

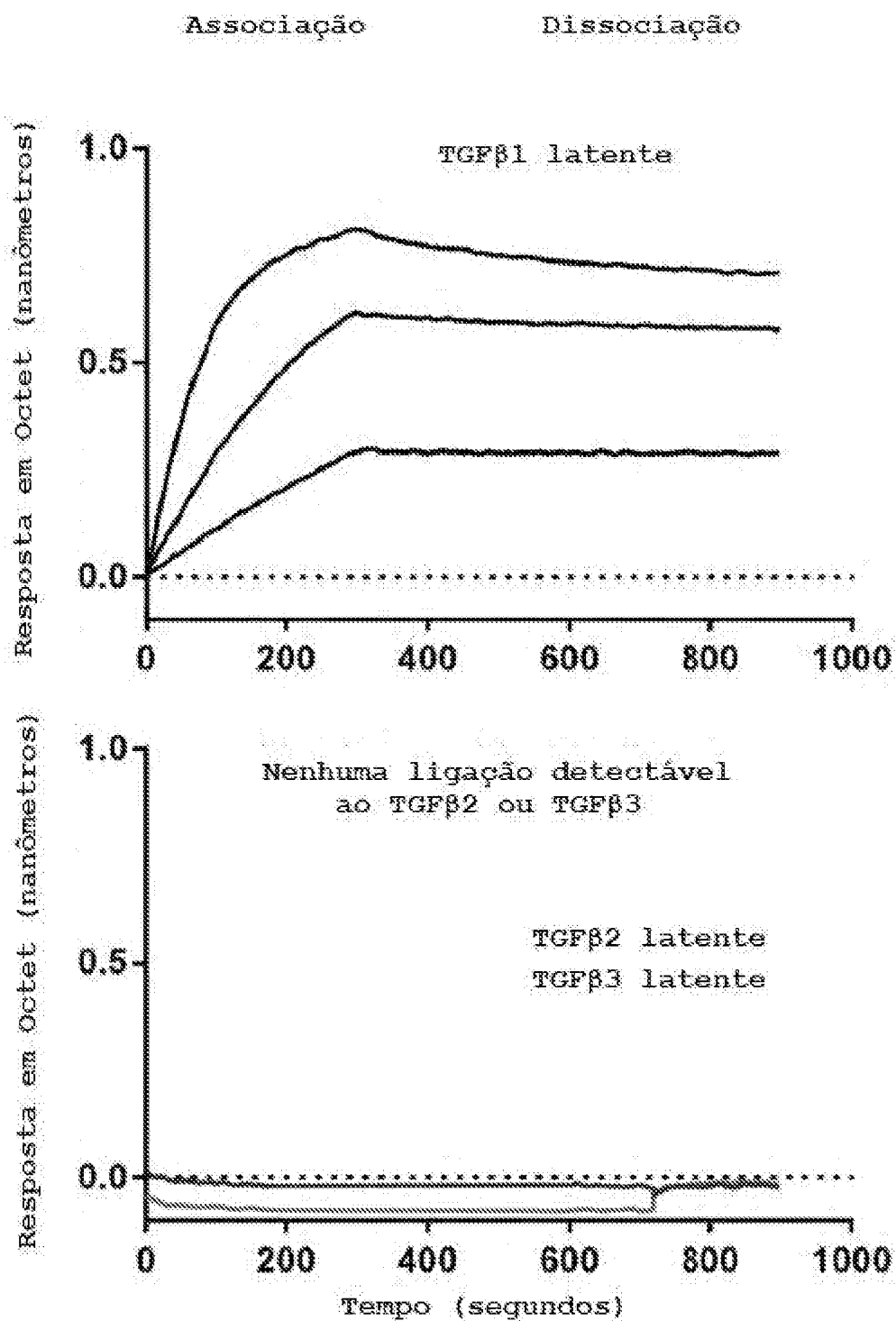


FIG. 4C

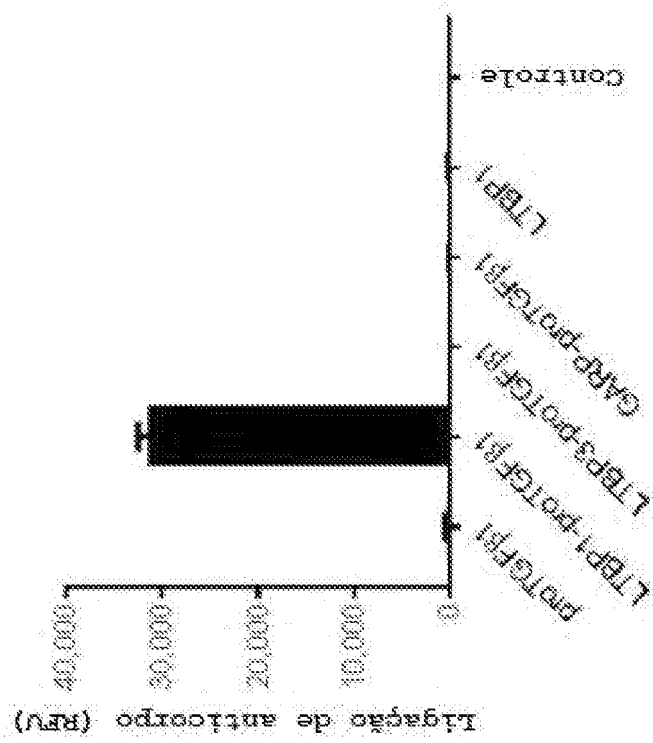


FIG. 4B

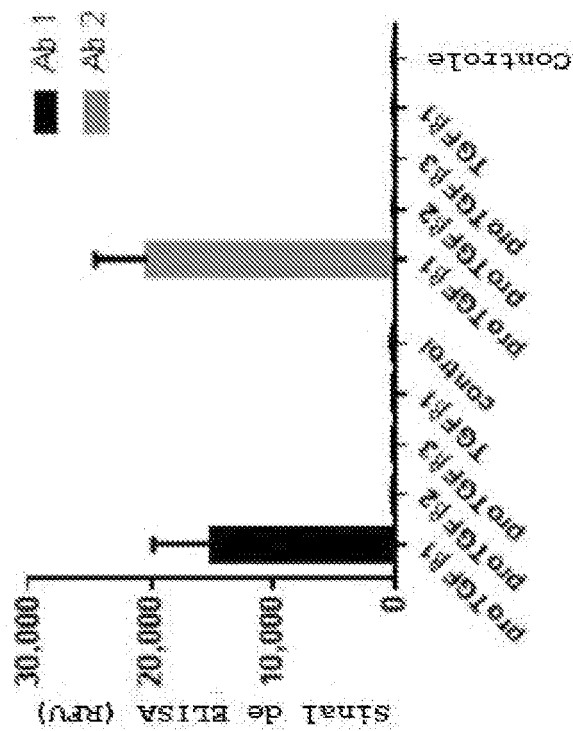


FIG. 5

	TGF β 1	TGF β 2	TGF β 3
C2	< 1 pM	Sem ligação	15.2 nM
C3	< 1 pM	23.4 nM	5.6 nM
C4	< 1 pM	< 1 pM	18.7 nM
C5	< 1 pM	< 1 pM	< 1 pM
C6	< 1 pM	1.7 nM	< 1 pM
C1	< 1 pM	2.8 nM	< 1 pM

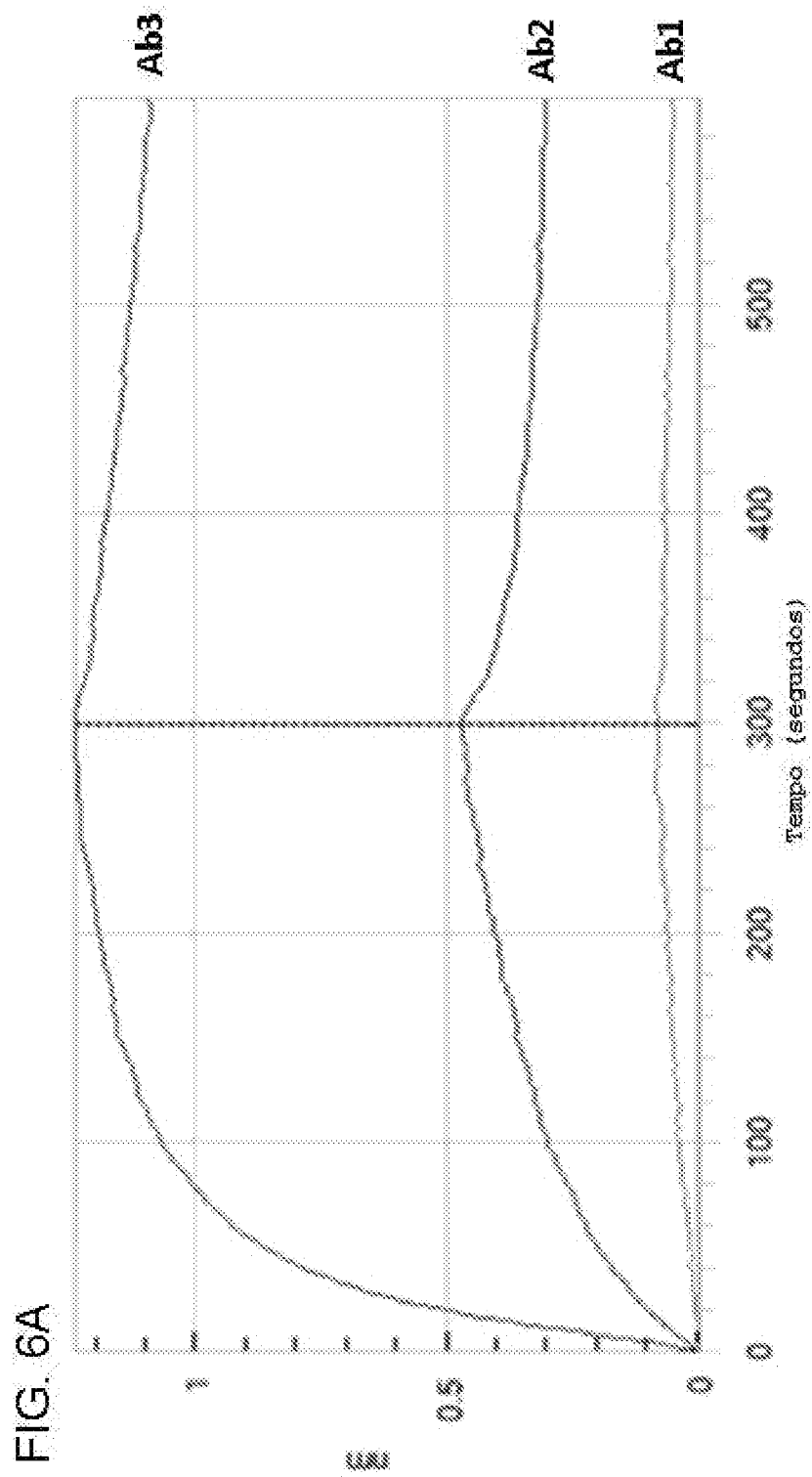


FIG. 6B Curvas de titulação: Captura de Fc - mAb - Ag

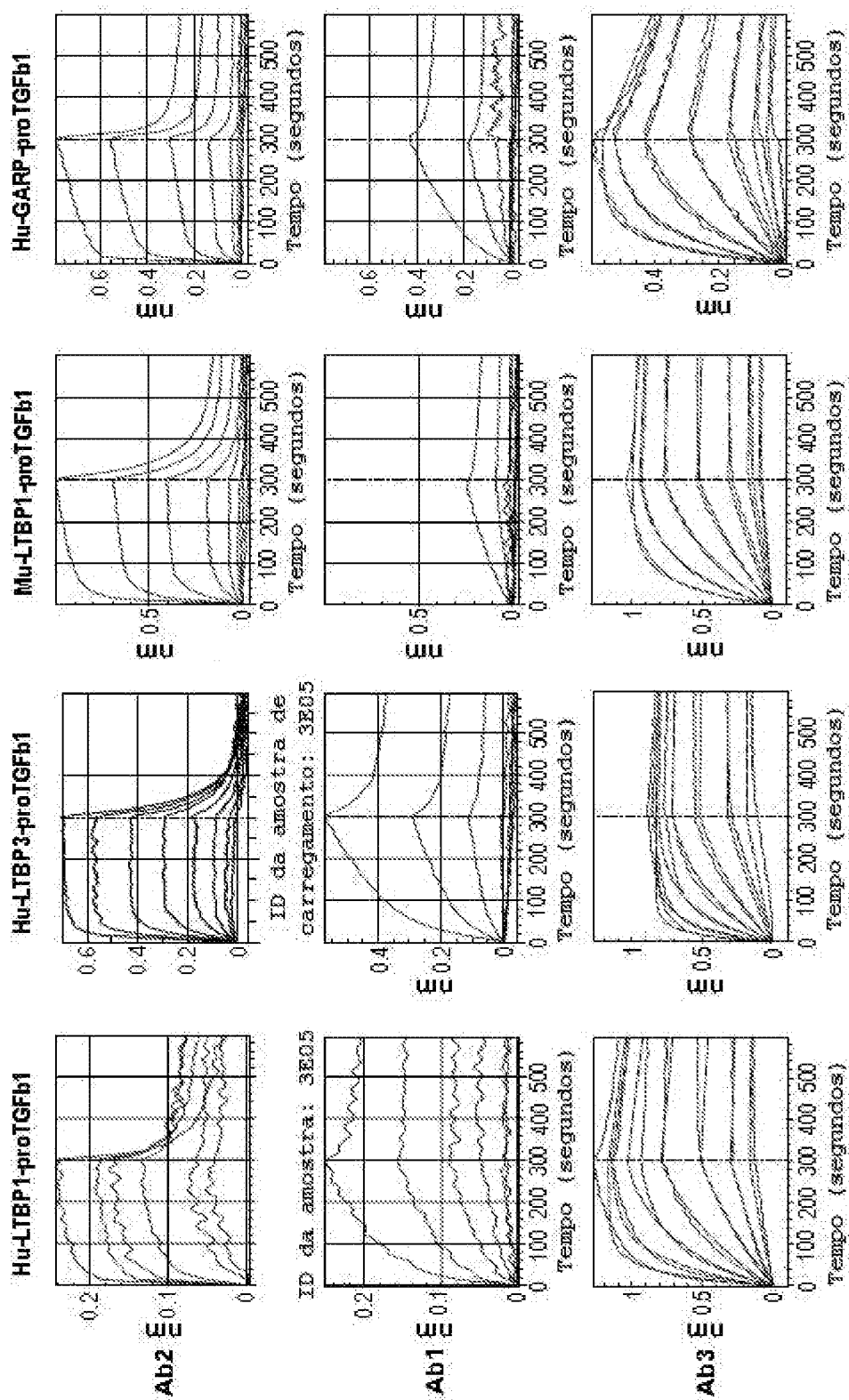


FIG. 7A

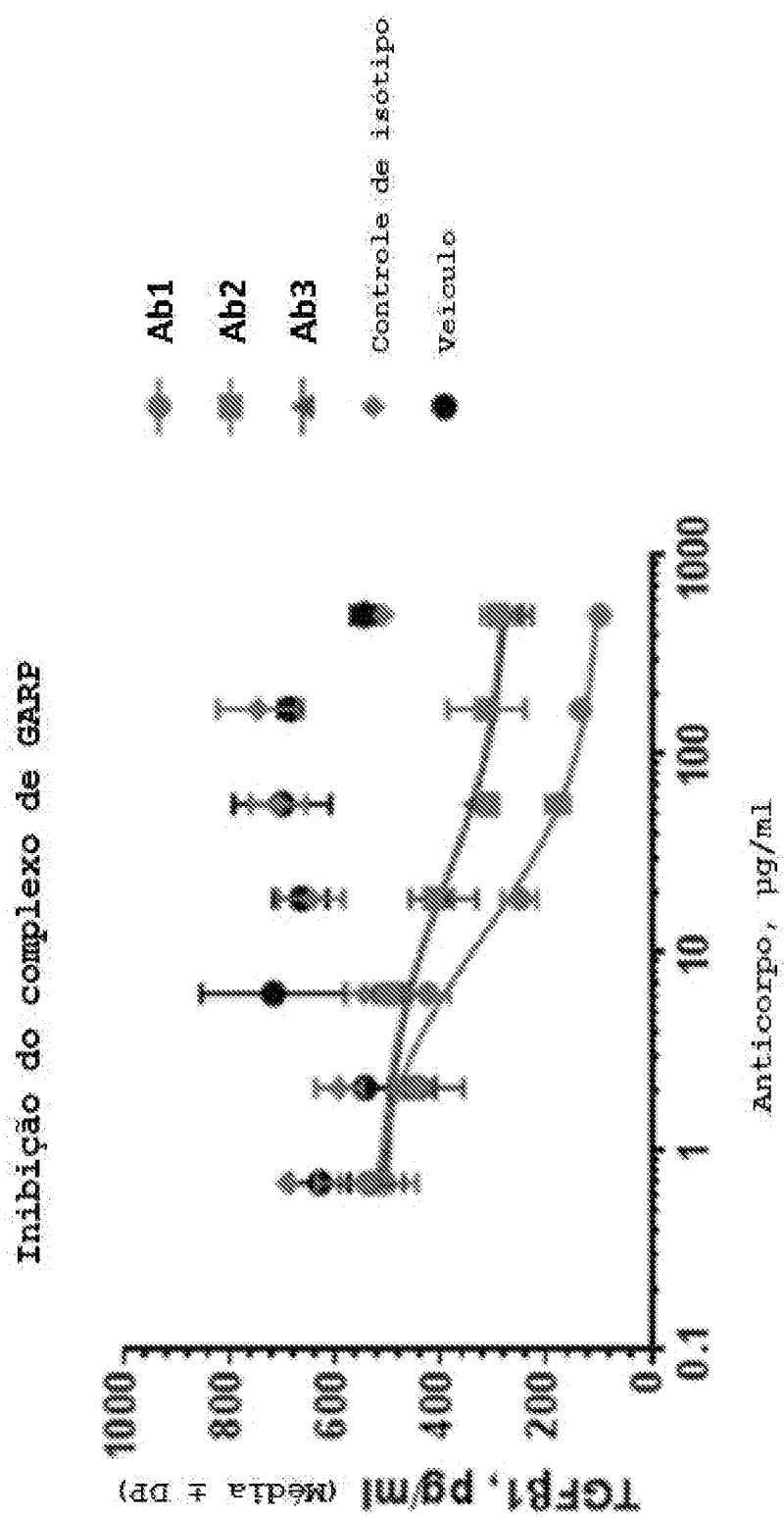


FIG. 7B

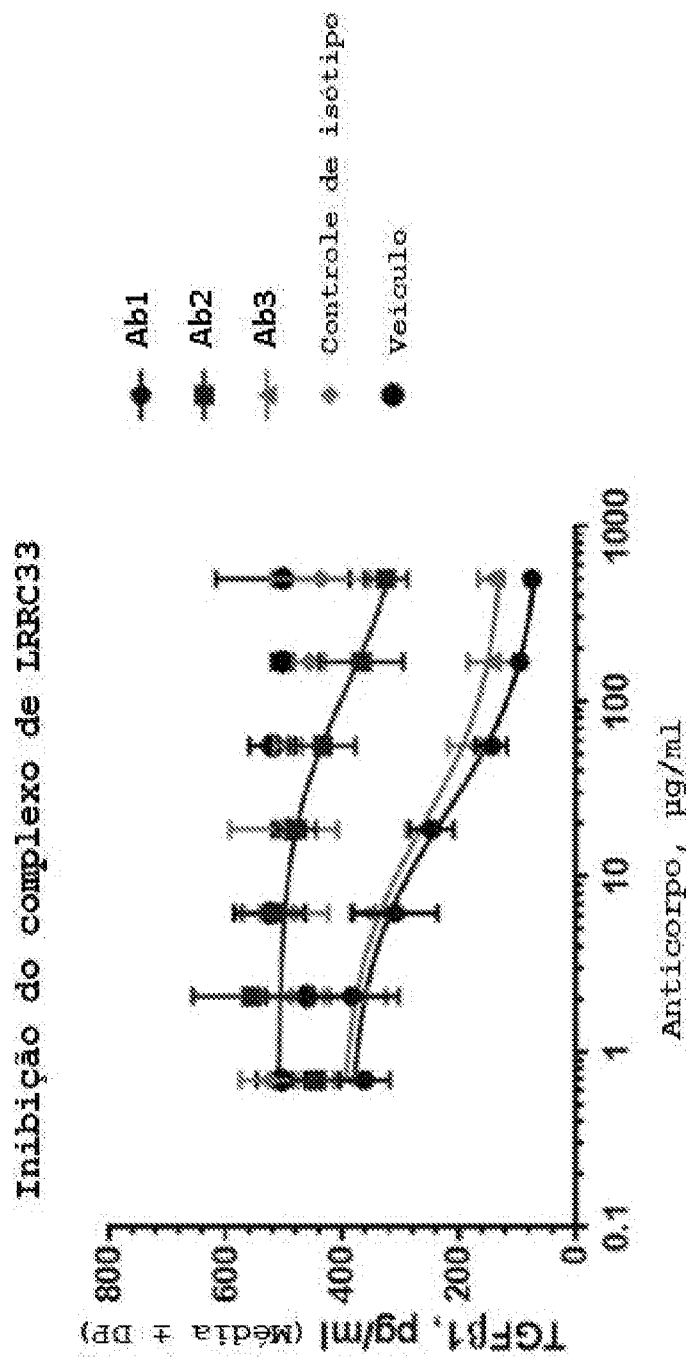
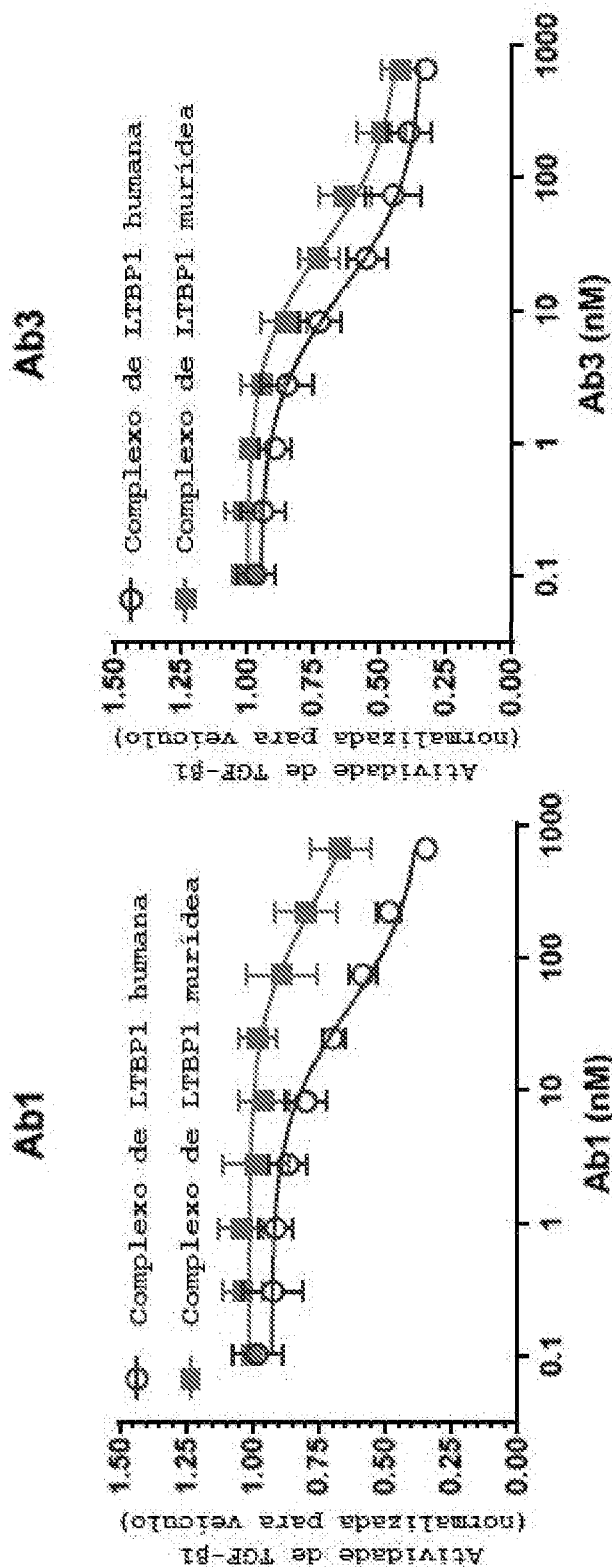


FIG. 7C: Inibição da ativação de de LTBP1-pró-TGF β 1 (ensaio LN229)



Inibição do complexo de GARP e LRRC33 por Ab2 nas Figs. 7A e 7B.

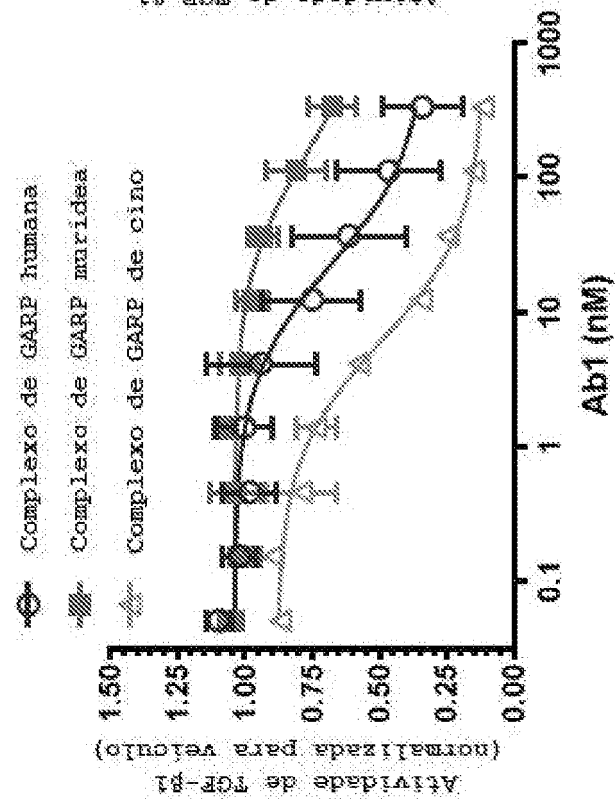
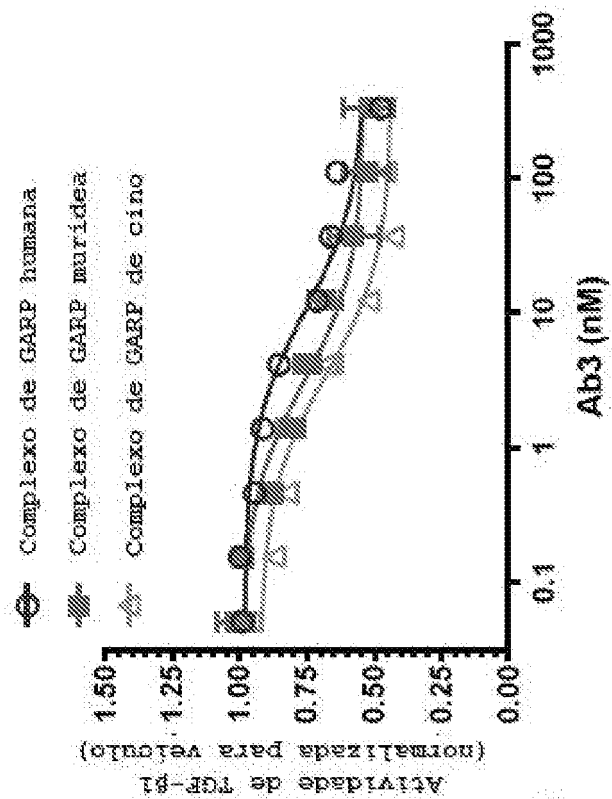
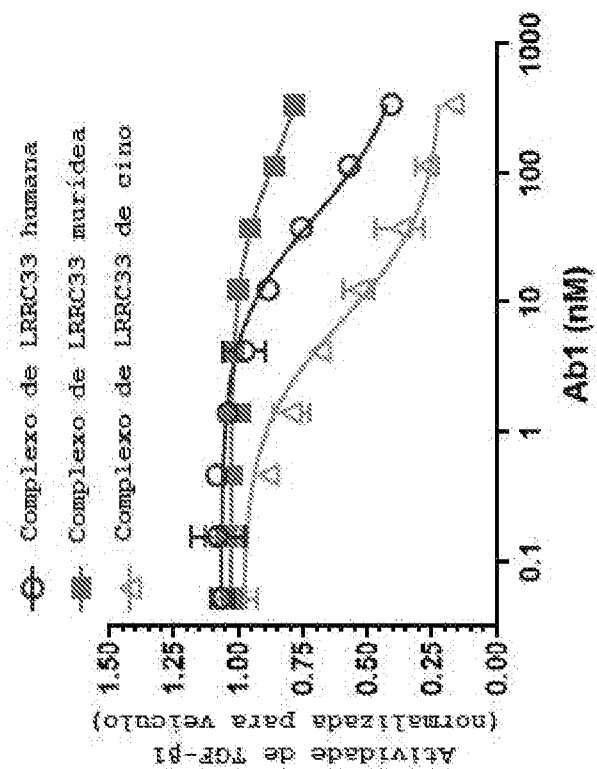
FIG. 7D: Inibição da ativação de GARP-pró-TGF β 1 (ensaio SW480b6)Ab1Ab3

FIG. 7E: Inibição da ativação de LRRC-33-pró-TGF β 1 (ensaio SW480b6)

Ab1



Ab3

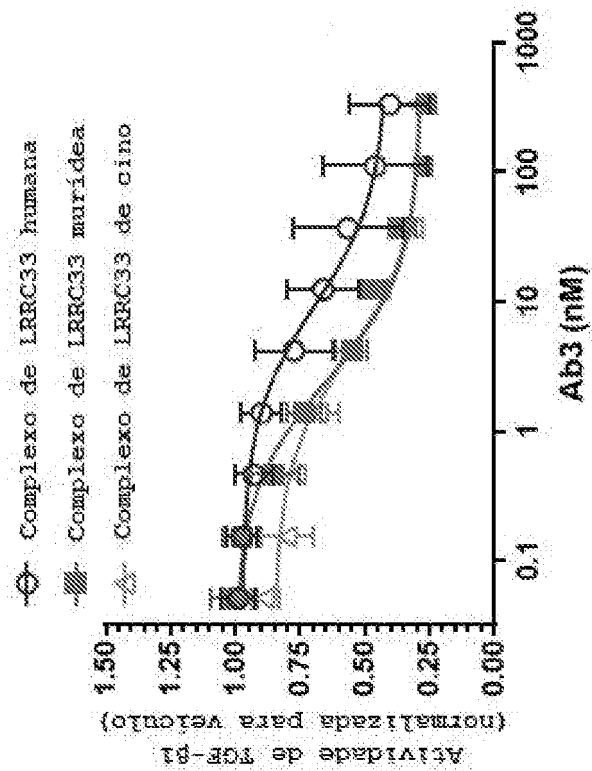


FIG. 7F

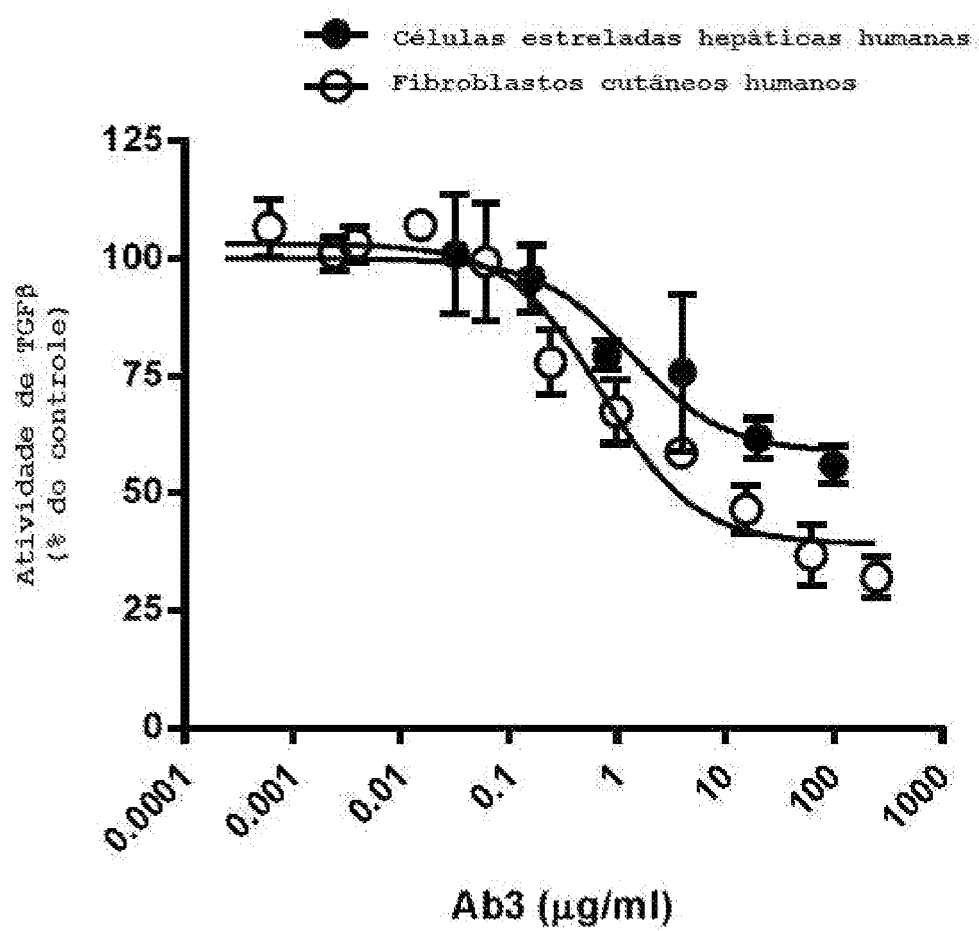


FIG. 7G

Ab1

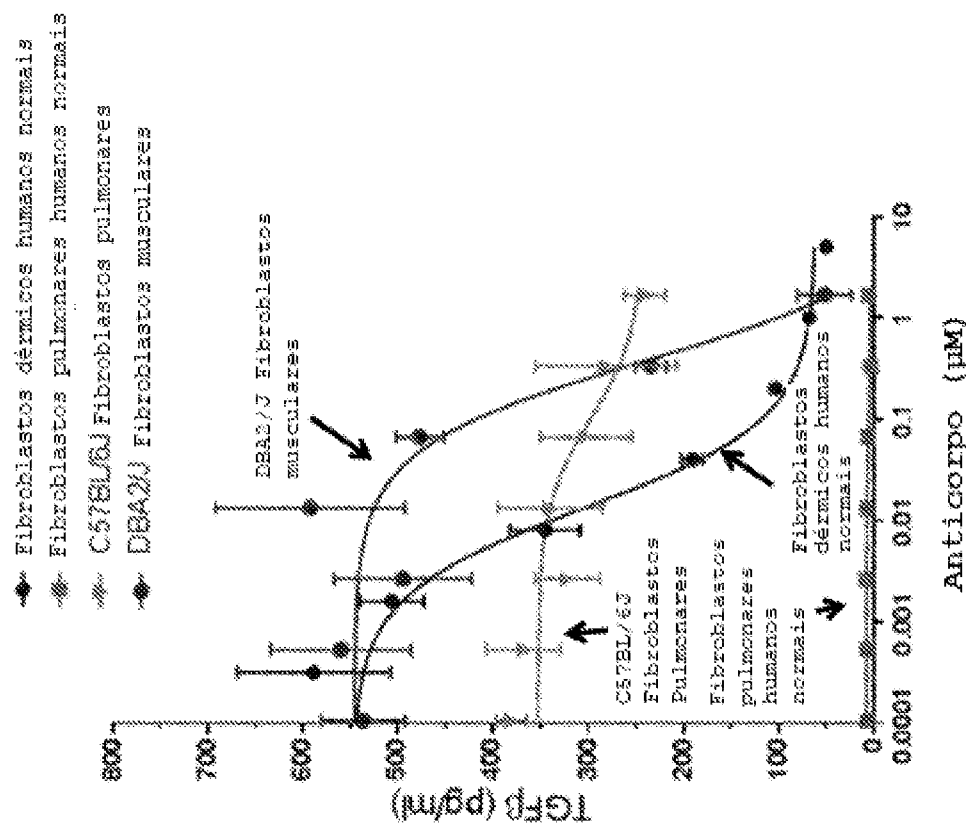


FIG. 7H

Ab2

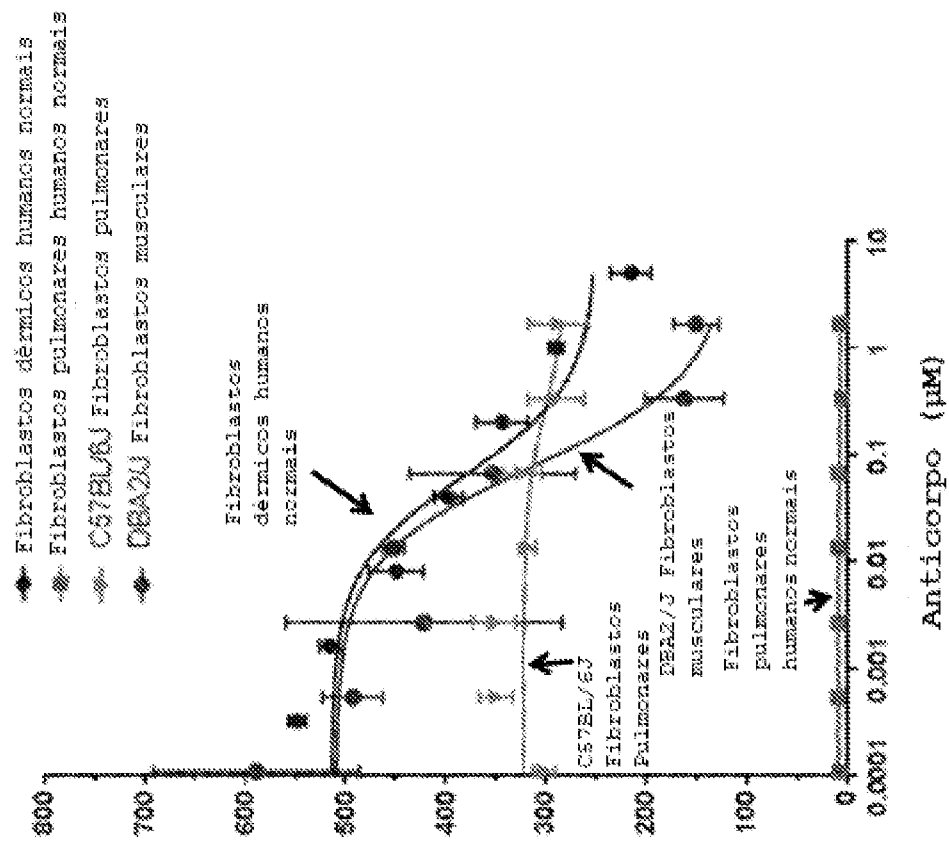


FIG. 8: Inibição da ativação de TGFβ1 protease-dependente

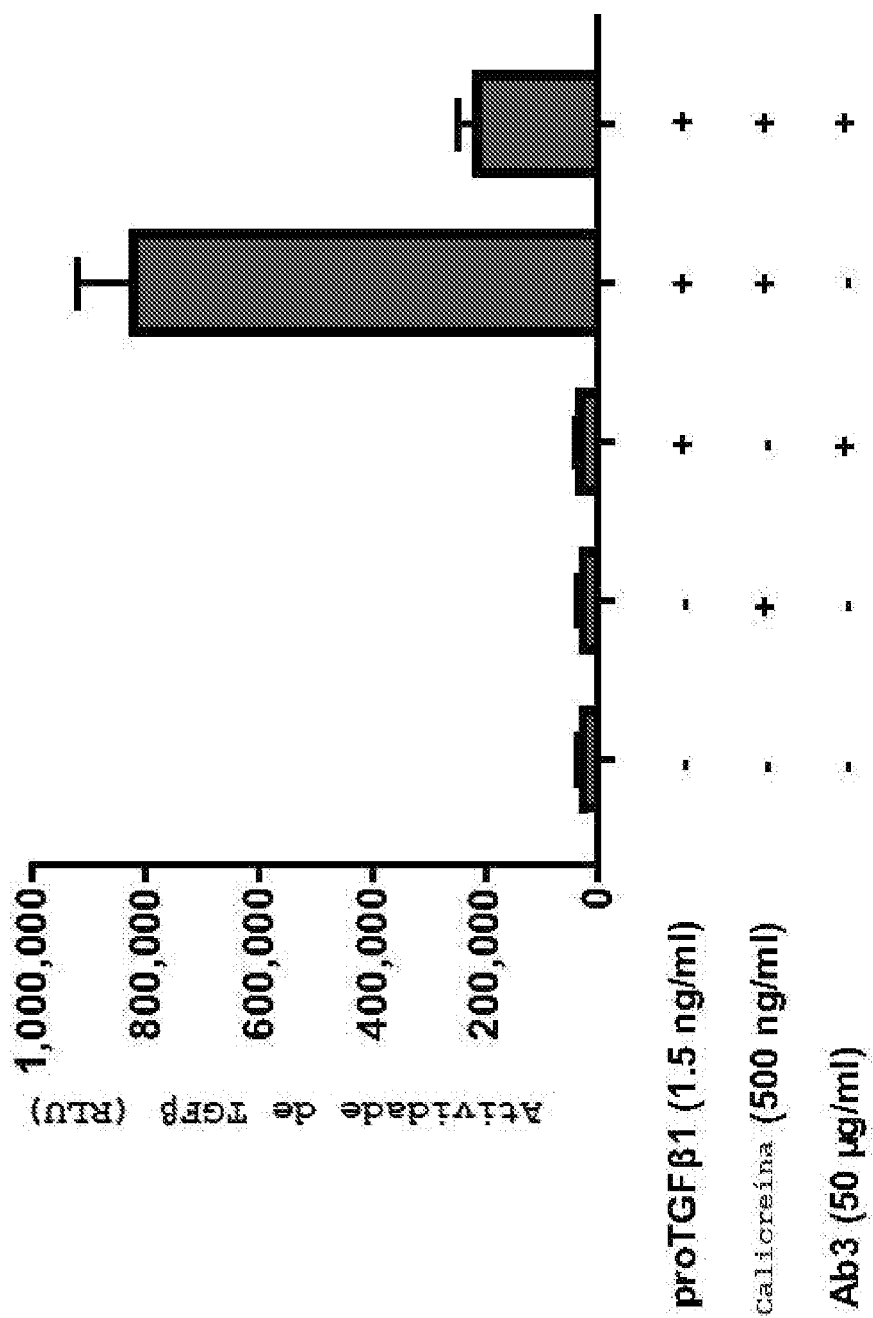


FIG. 9A

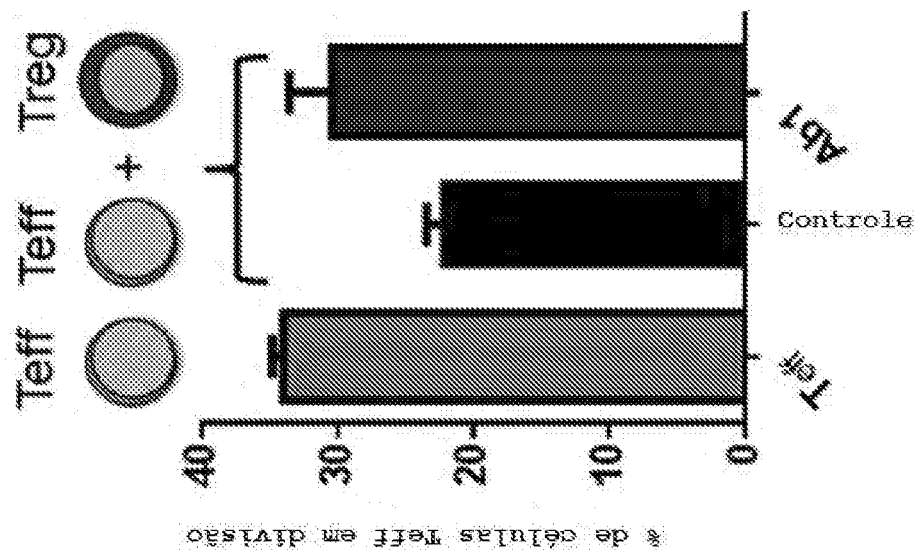
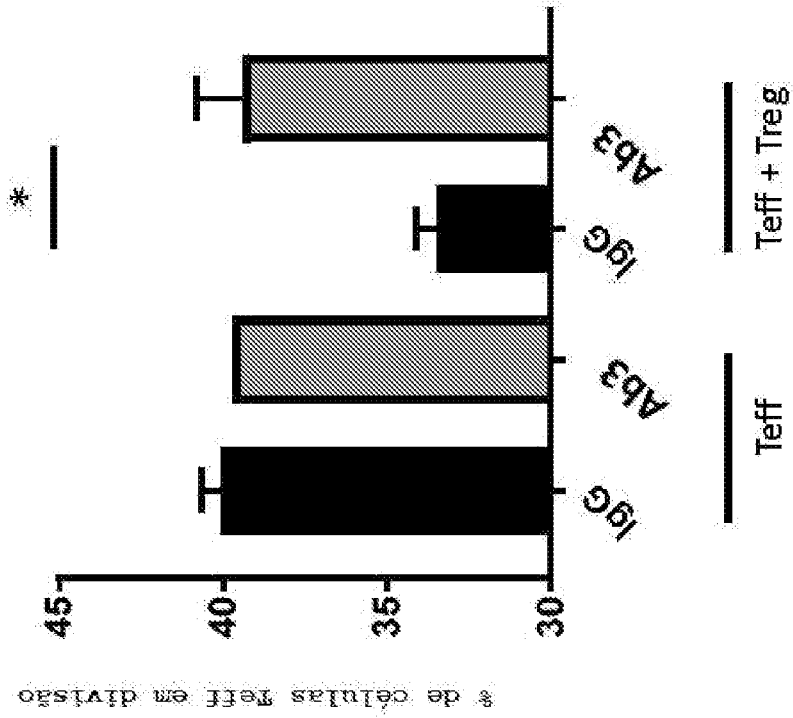
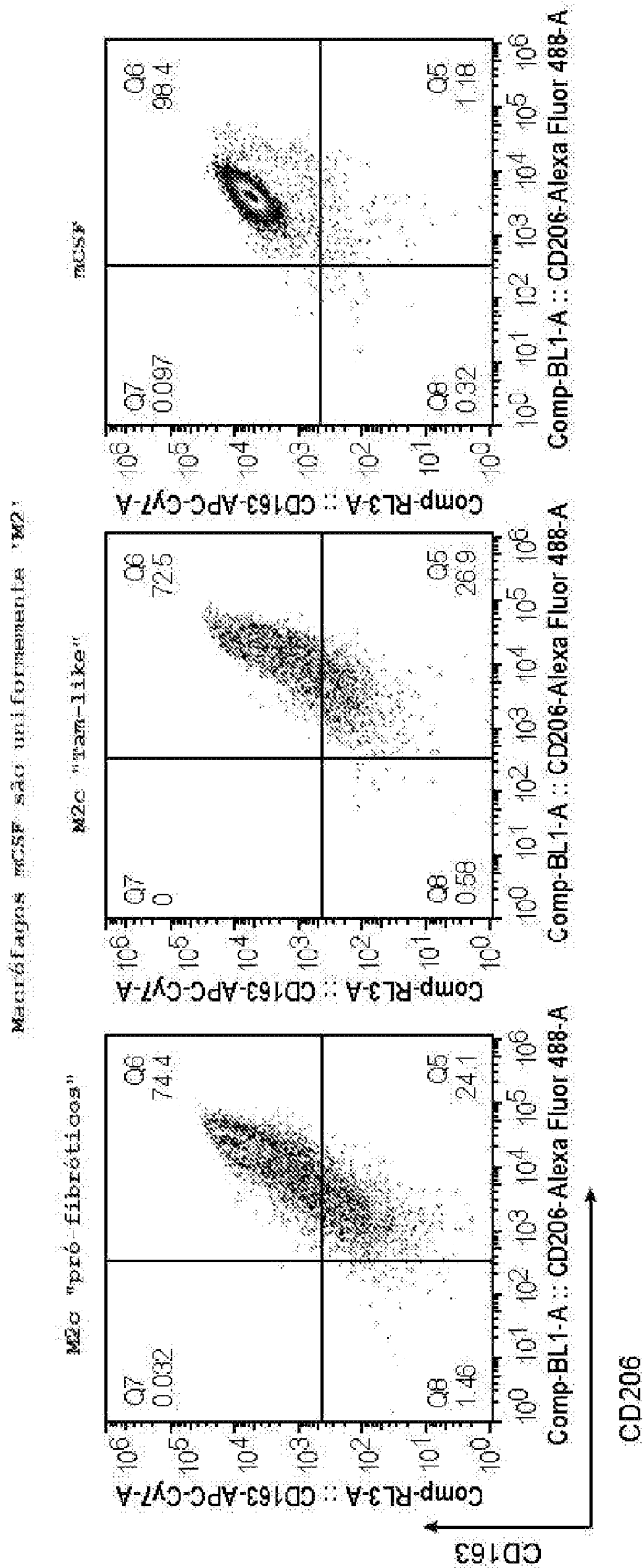


FIG. 9B



*p < 0,05 (Teste-t bicaudado)

FIG. 10A



FPMC de doadores saudáveis
Seleção imunomagnética CD14⁺ = monócitos
Cultura de aproximadamente 1 semana com soro humano 10% + CMCSF ou MCSF
Para induzir vários macrófagos M2: cultura de mais 2-3 dias com: M2c: IL10+GFb, M2d: IL6

CD163 - Receptor do limpador de hemoglobina
CD206 - Receptor de Manose

FIG. 10B

Macrófagos mCSF expressam uniformemente LRRC33

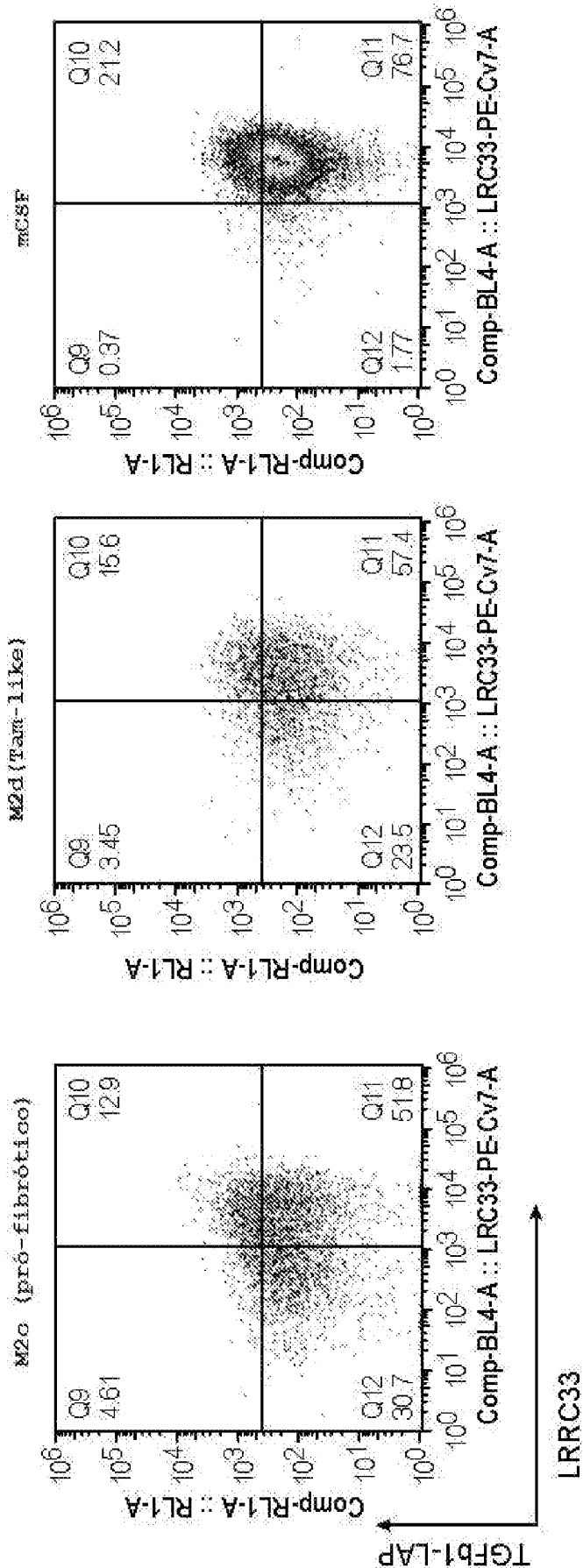


FIG. 10C

Expressão robusta de LRRC33 em macrófagos MCSF

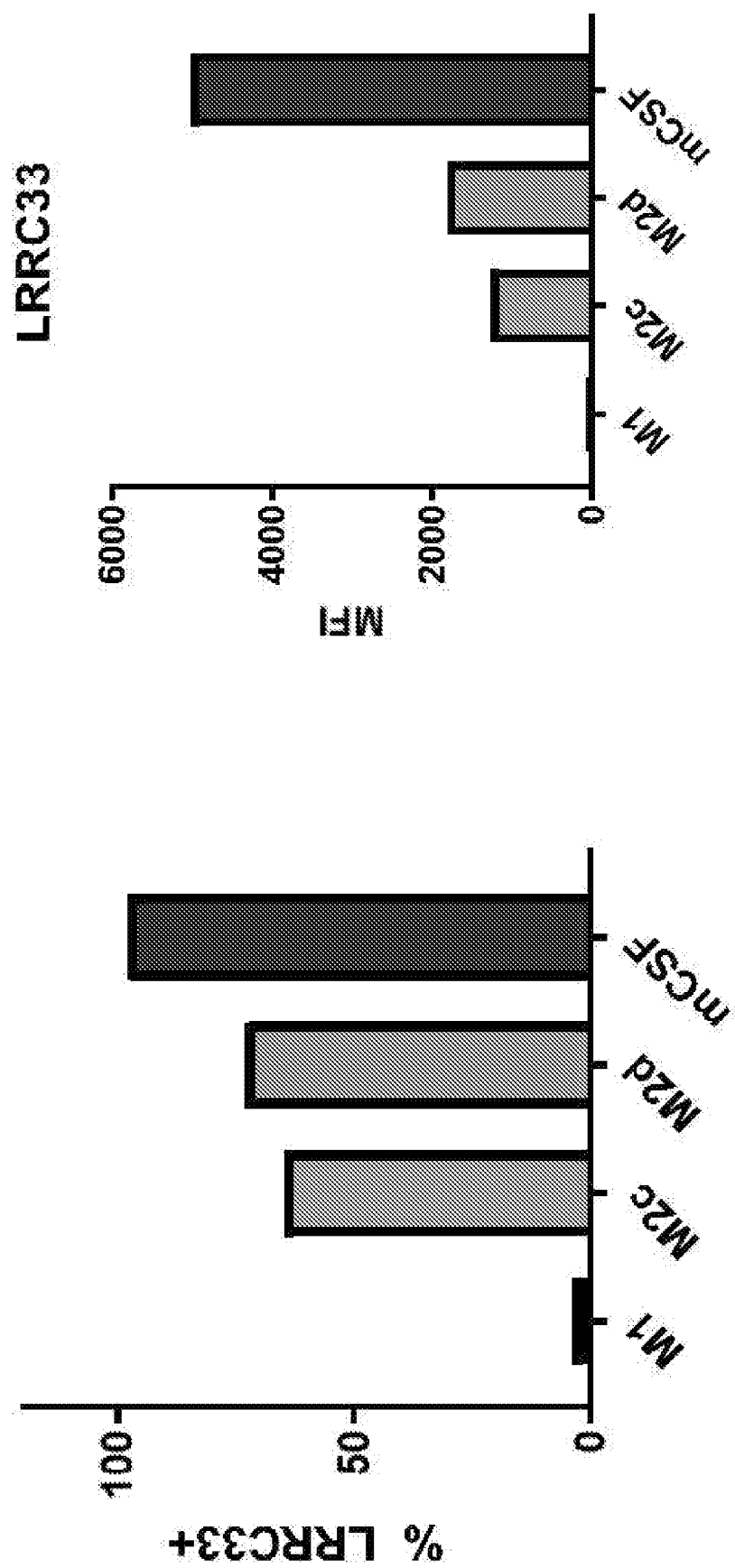
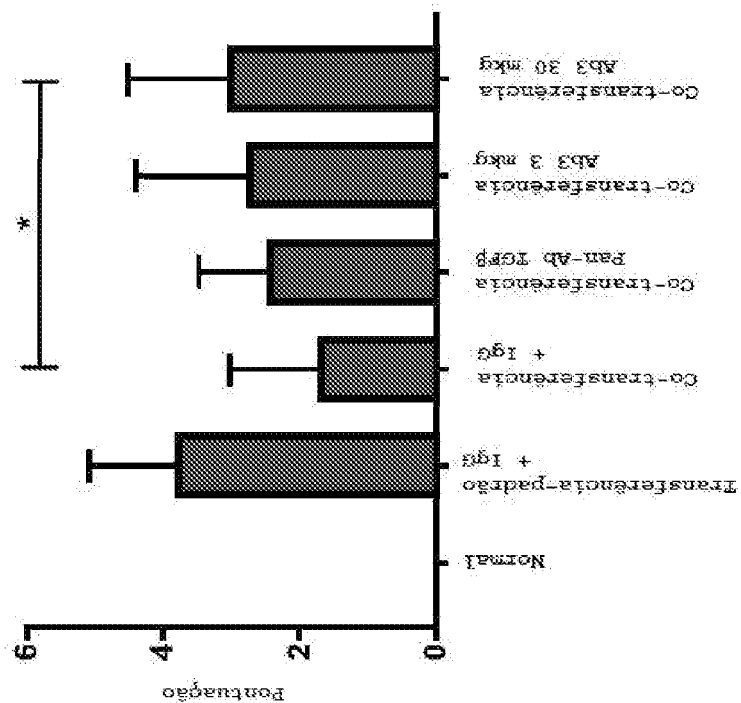
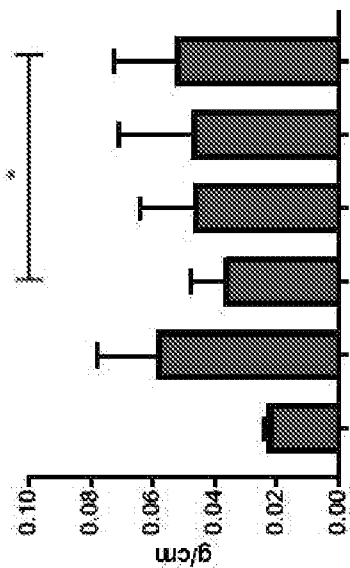


FIG. 11

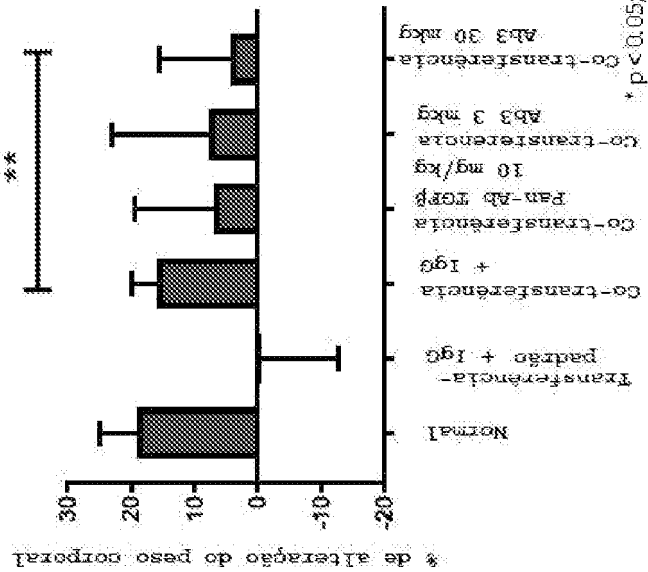
Pontuação de inflamação no cólon proximal



Proporção peso/comprimento do cólon



Alterações no peso corporal



* p < 0.05; ** p < 0.01

FIG. 12A

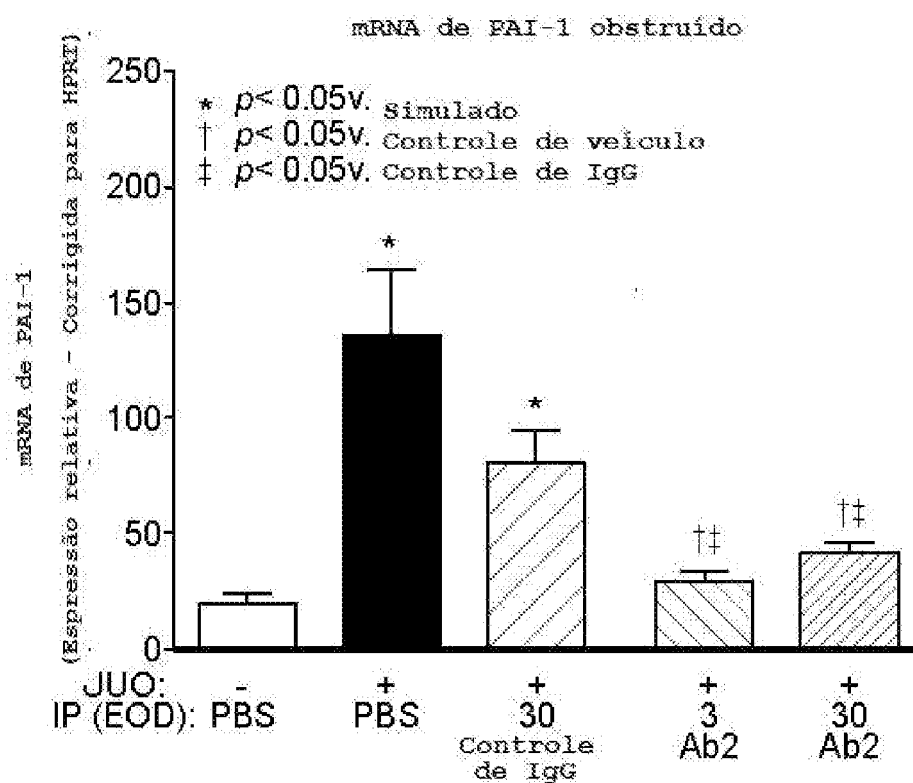


FIG. 12B

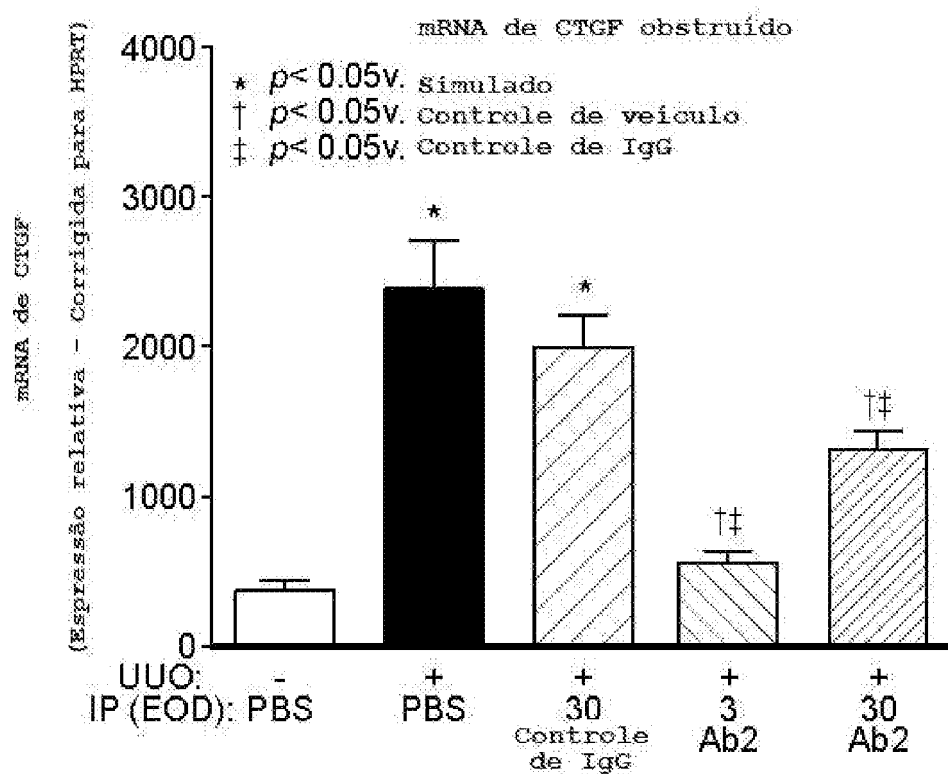


FIG. 12C

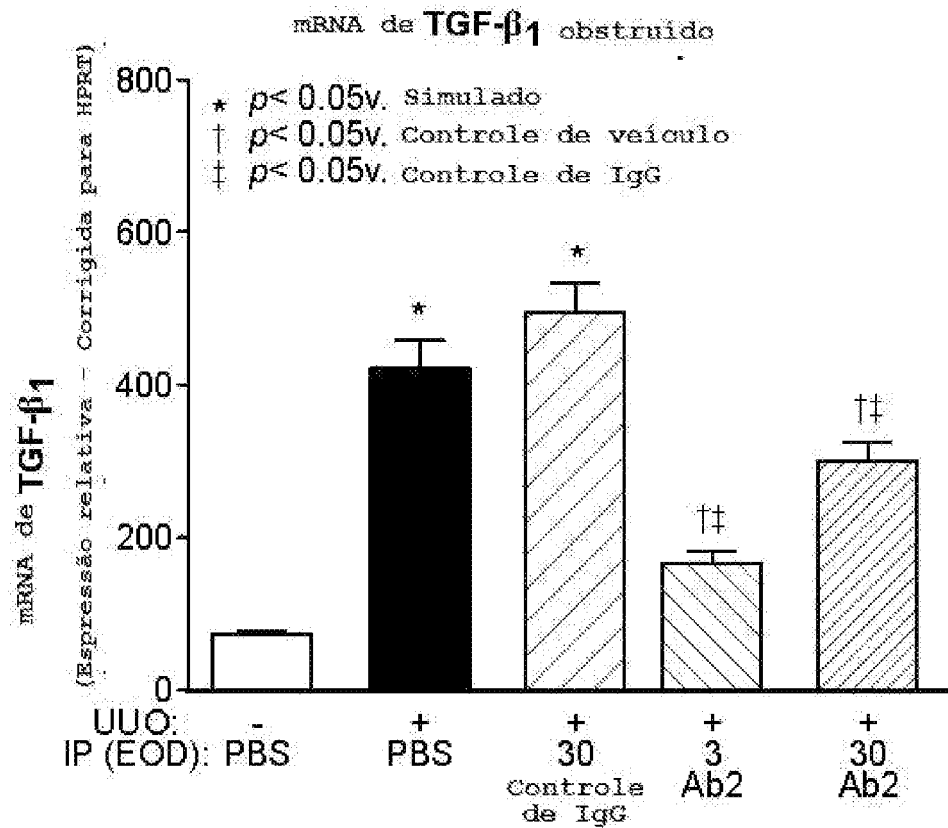


FIG. 12D

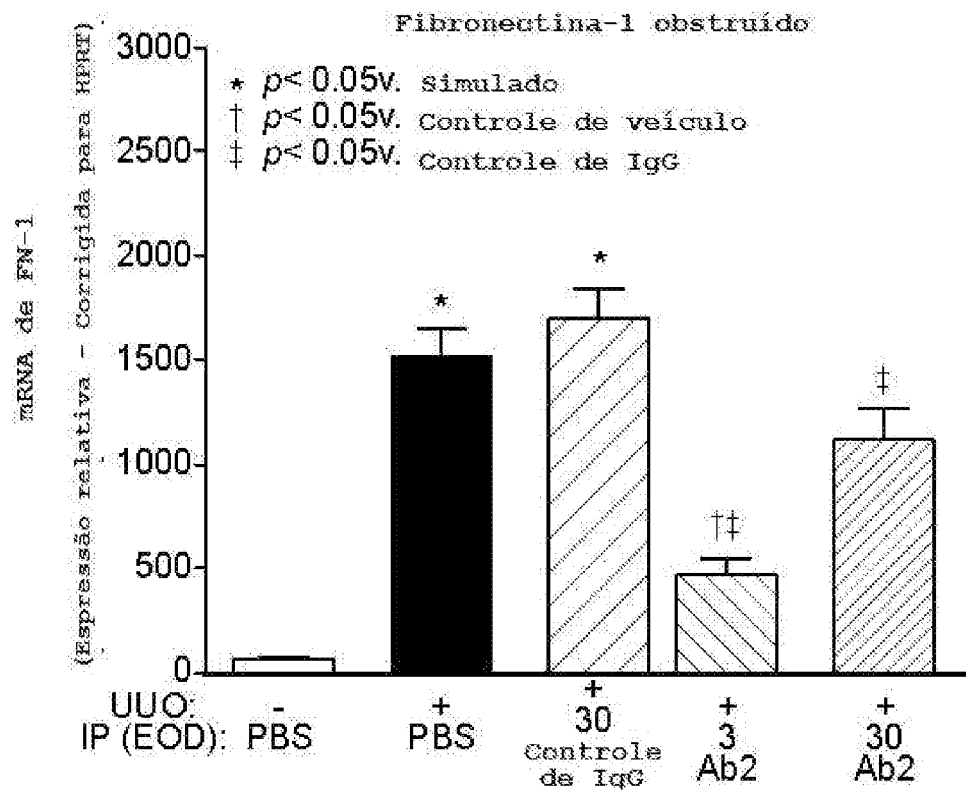


FIG. 12E

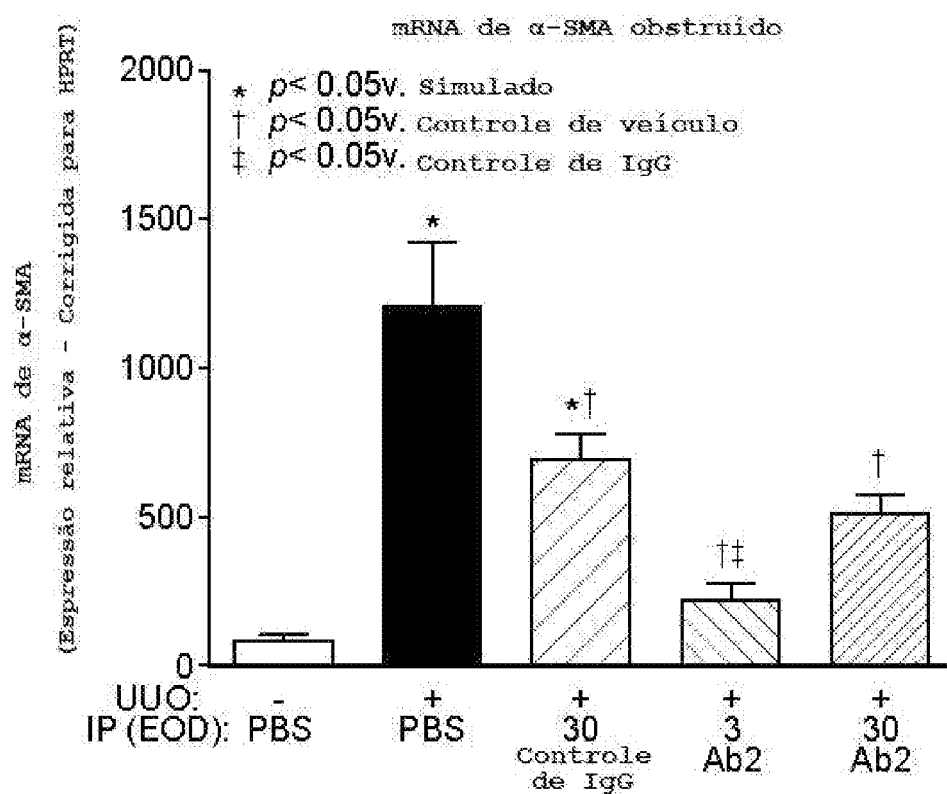


FIG. 12F

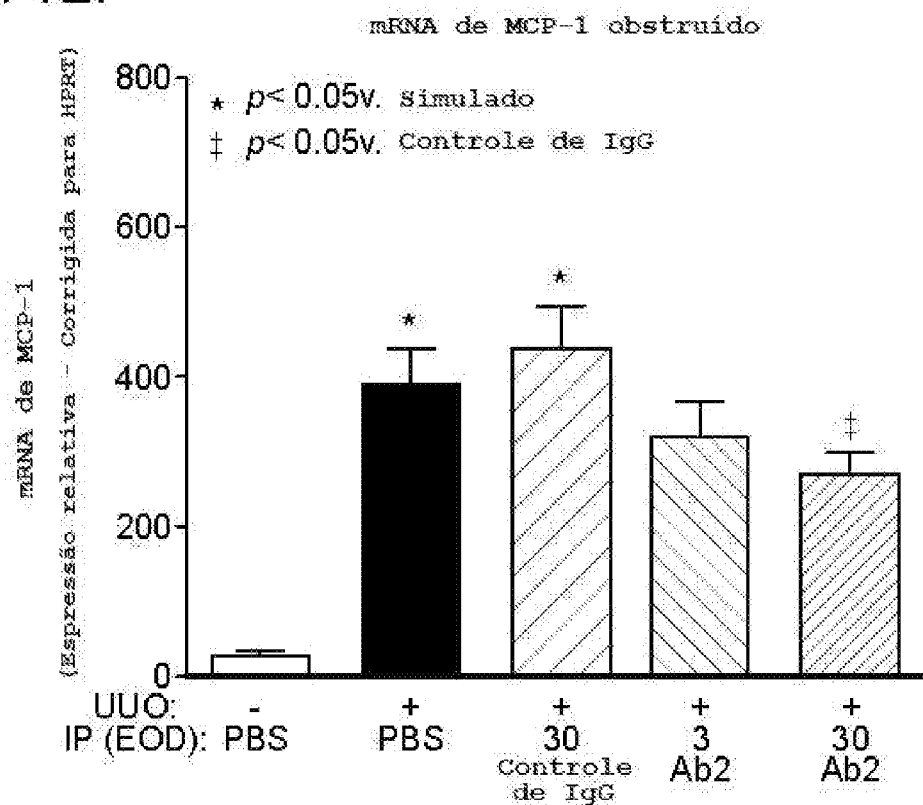


FIG. 12G

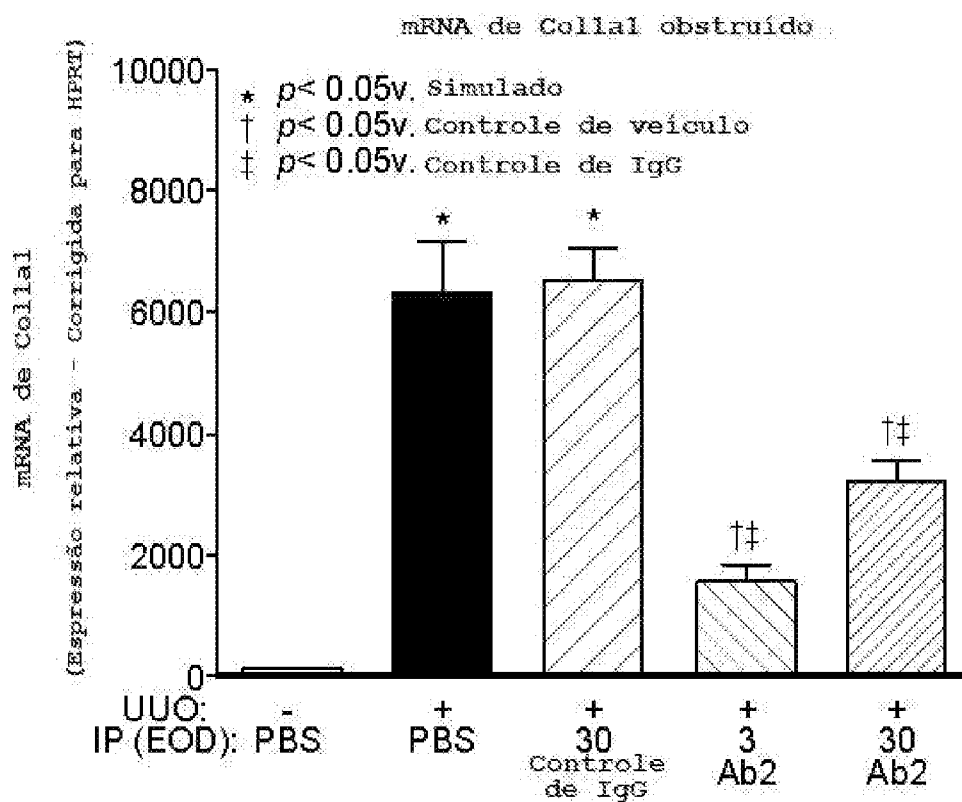


FIG. 12H

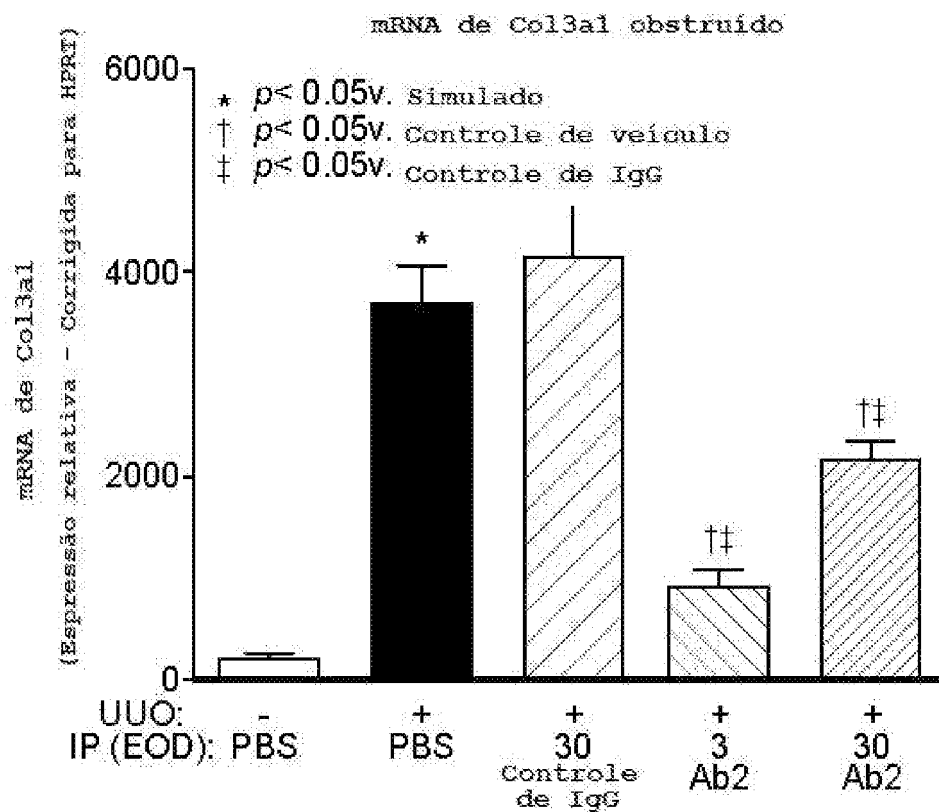


FIG. 12J

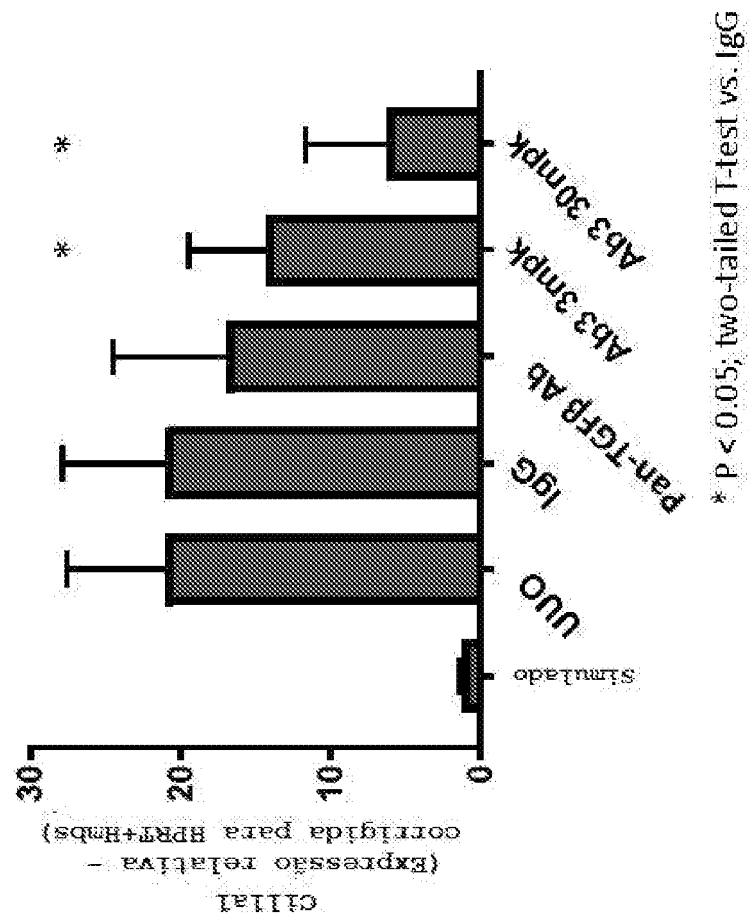


FIG. 12I

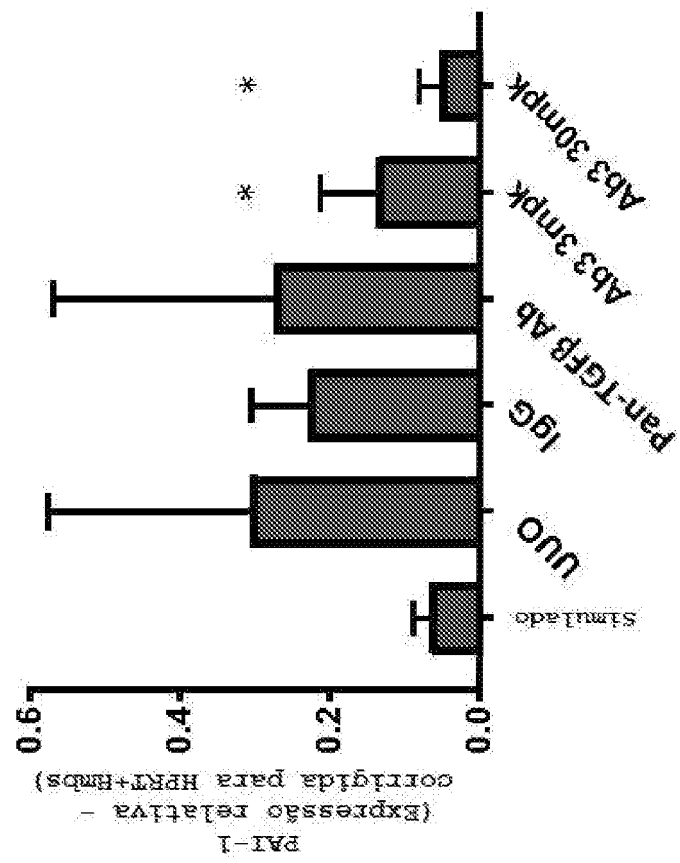
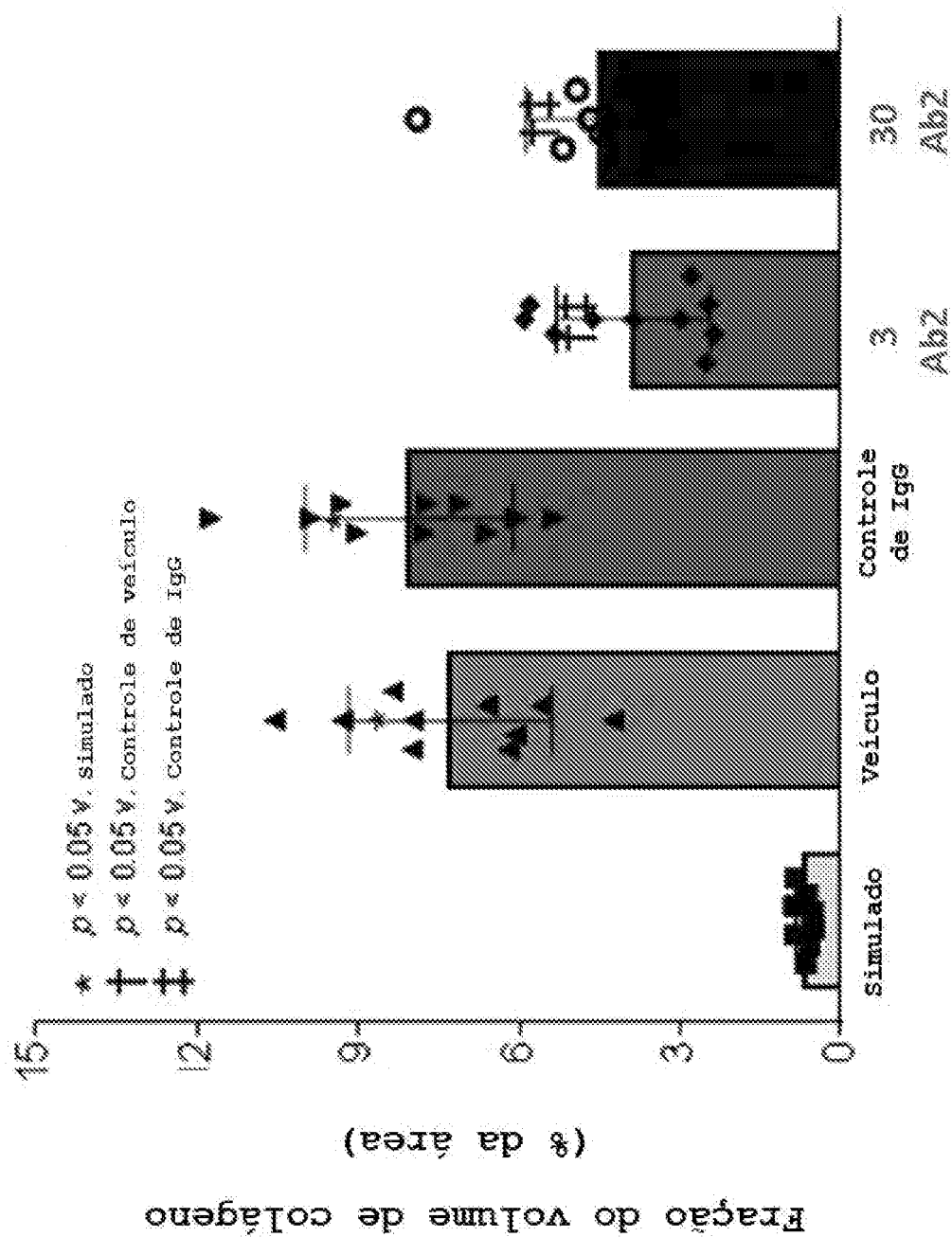


FIG. 12K



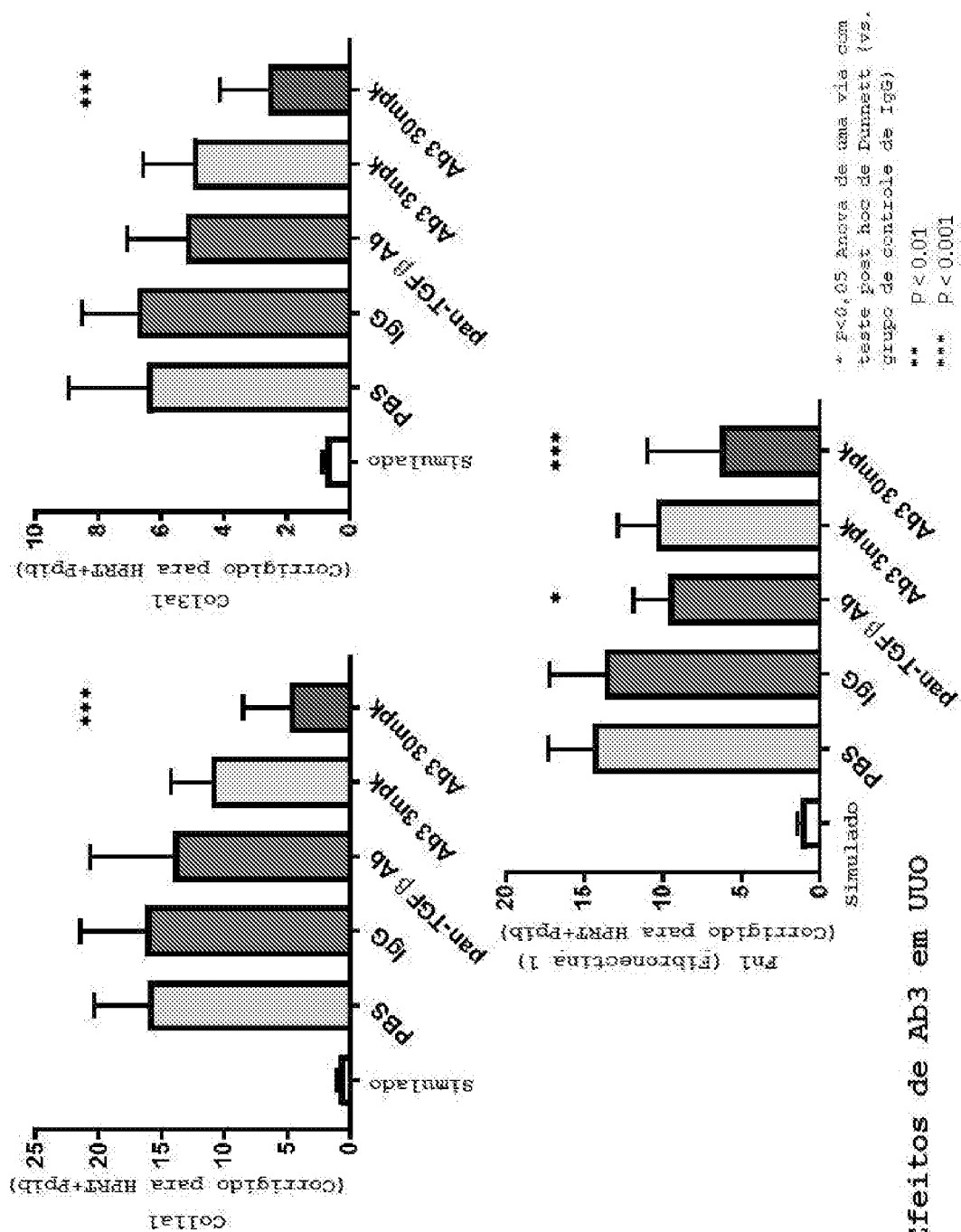
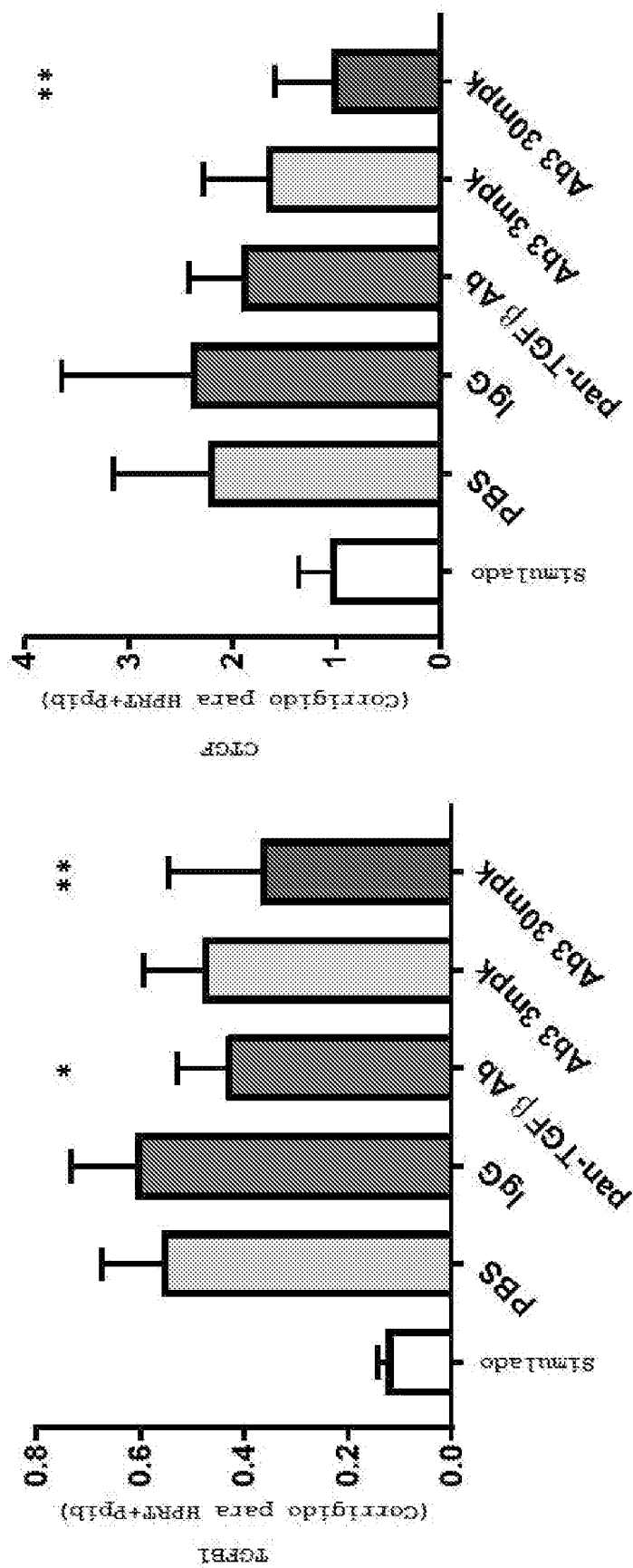


FIG. 13A: Efeitos de Ab3 em UUO

FIG. 13B



* P < 0.05 Anova de uma via com teste post hoc de Dunnett (vs. grupo de controle de IgG)
 ** P < 0.01
 *** P < 0.001

FIG. 13C

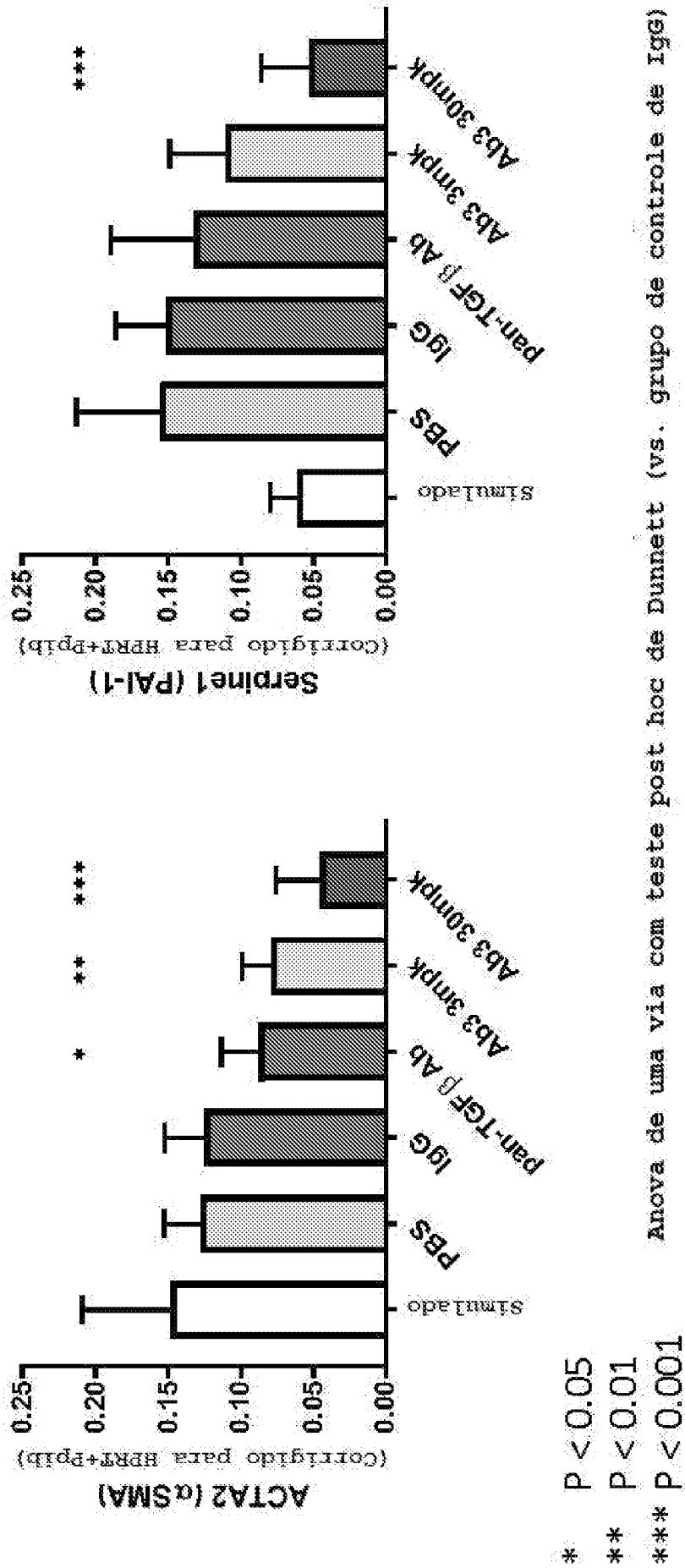
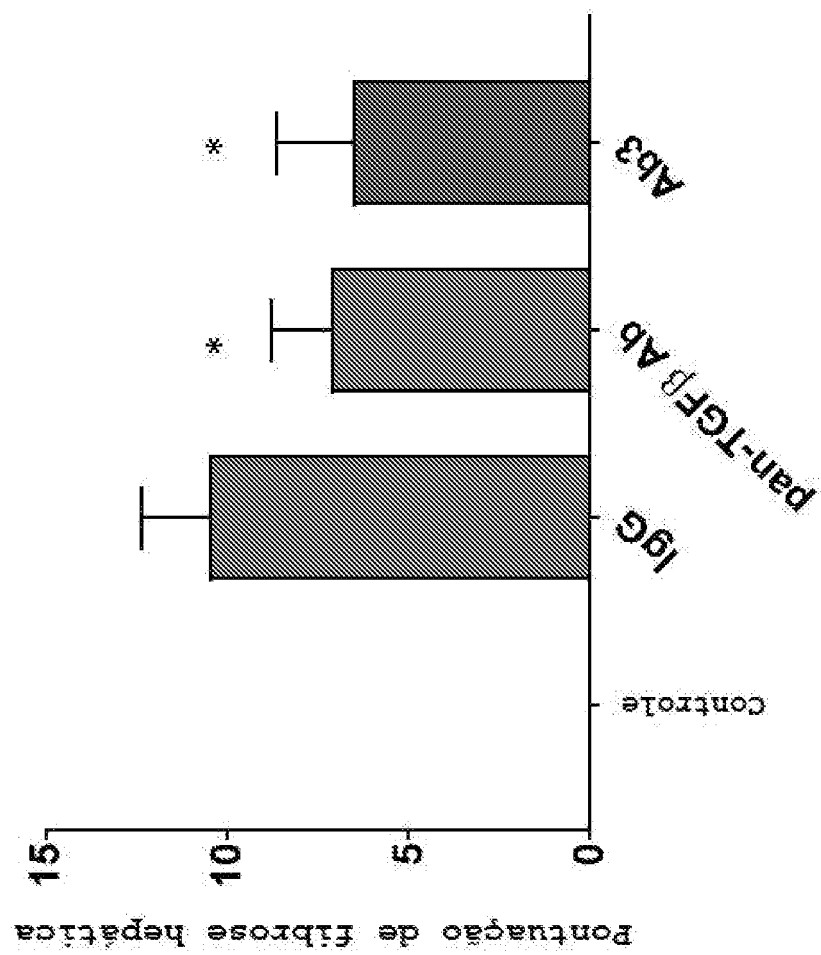


FIG. 14



* $P < 0,0001$ (Anova de uma via vs. IgG)

FIG. 15: Engajamento ao alvo no Estudo de Alport
Proporção pSmad2/3 : Smad2/3

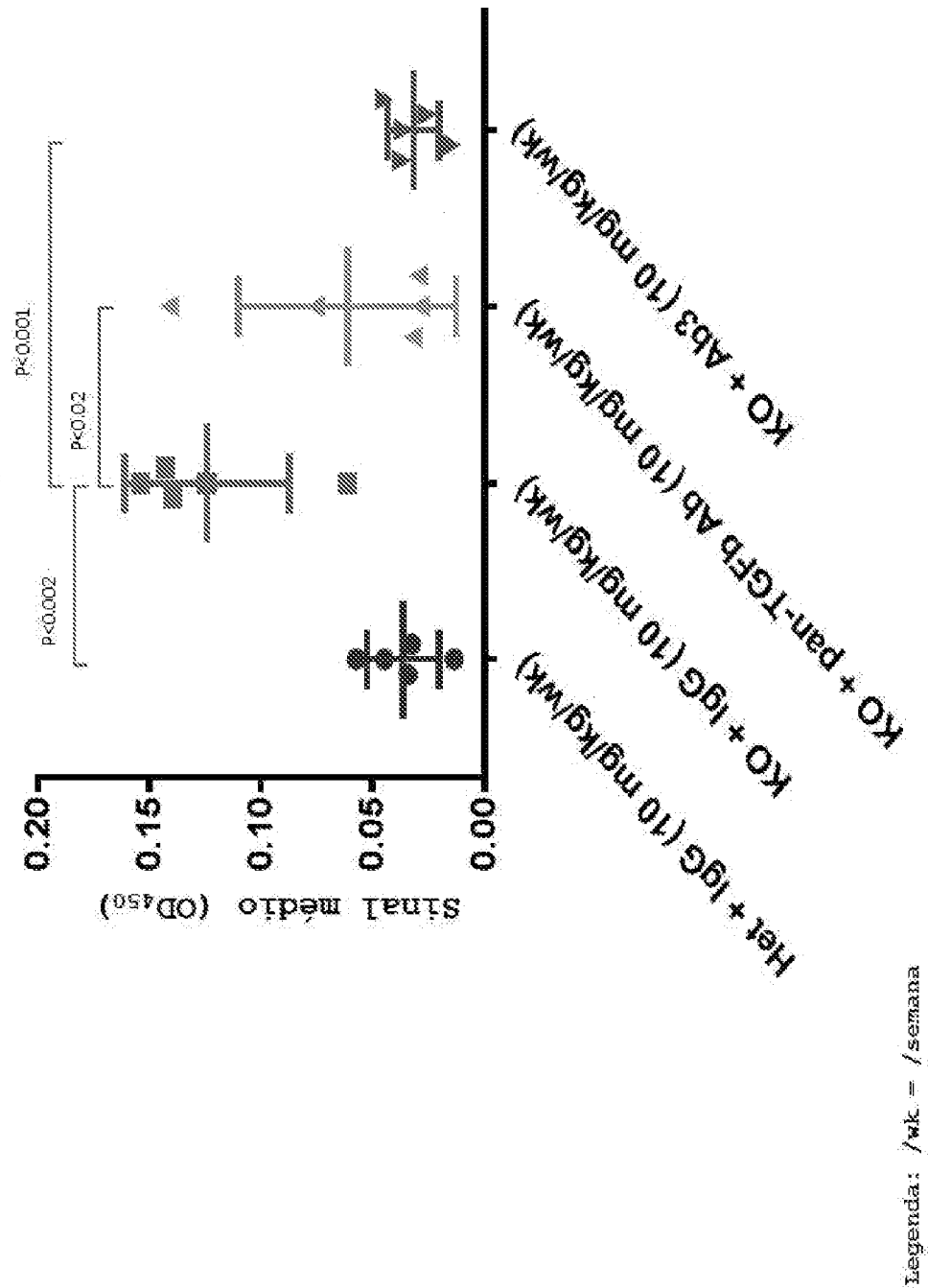


FIG. 16

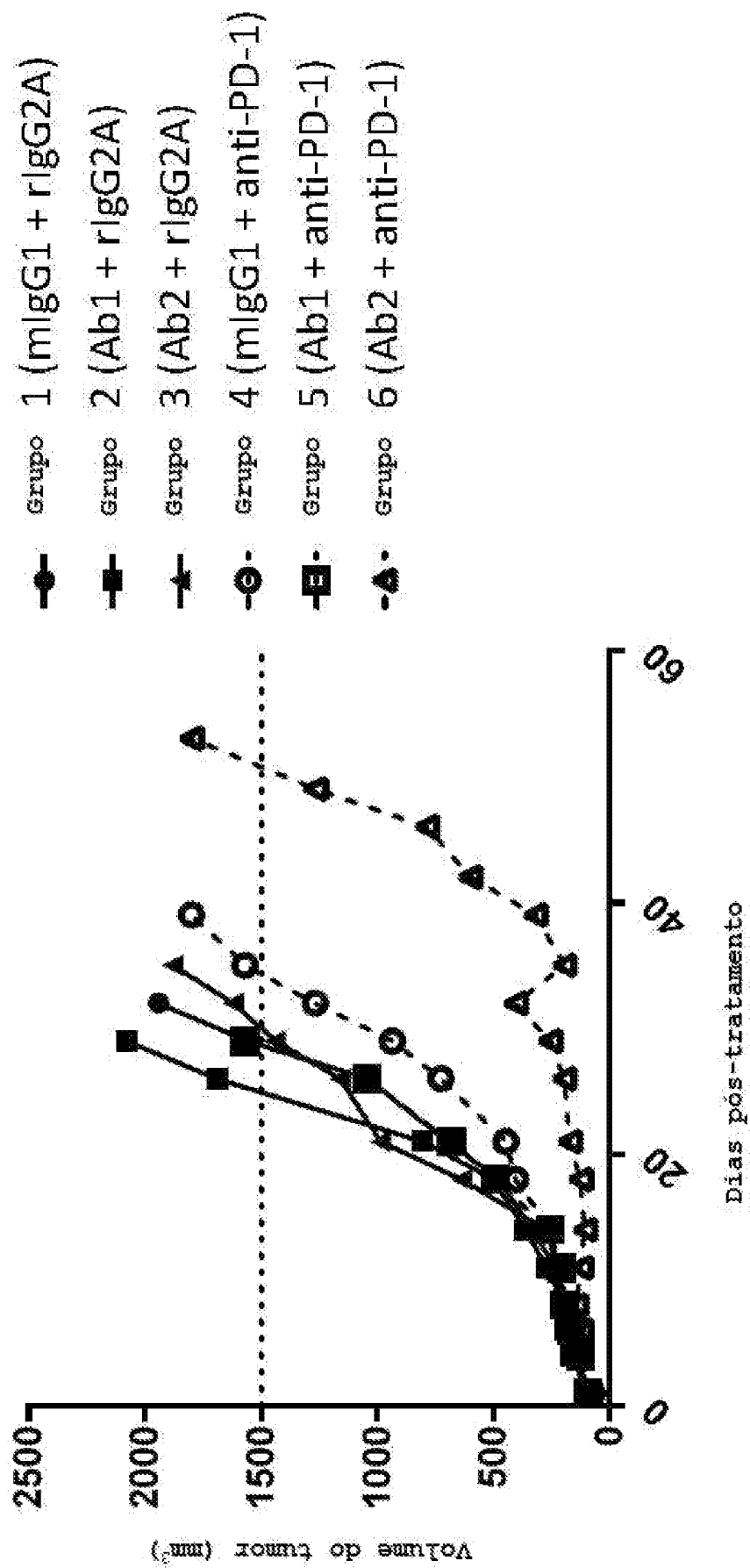


FIG. 17

Efeitos de AB3 sobre a sobrevida em
Modelo de tumor EMT6 muríneo

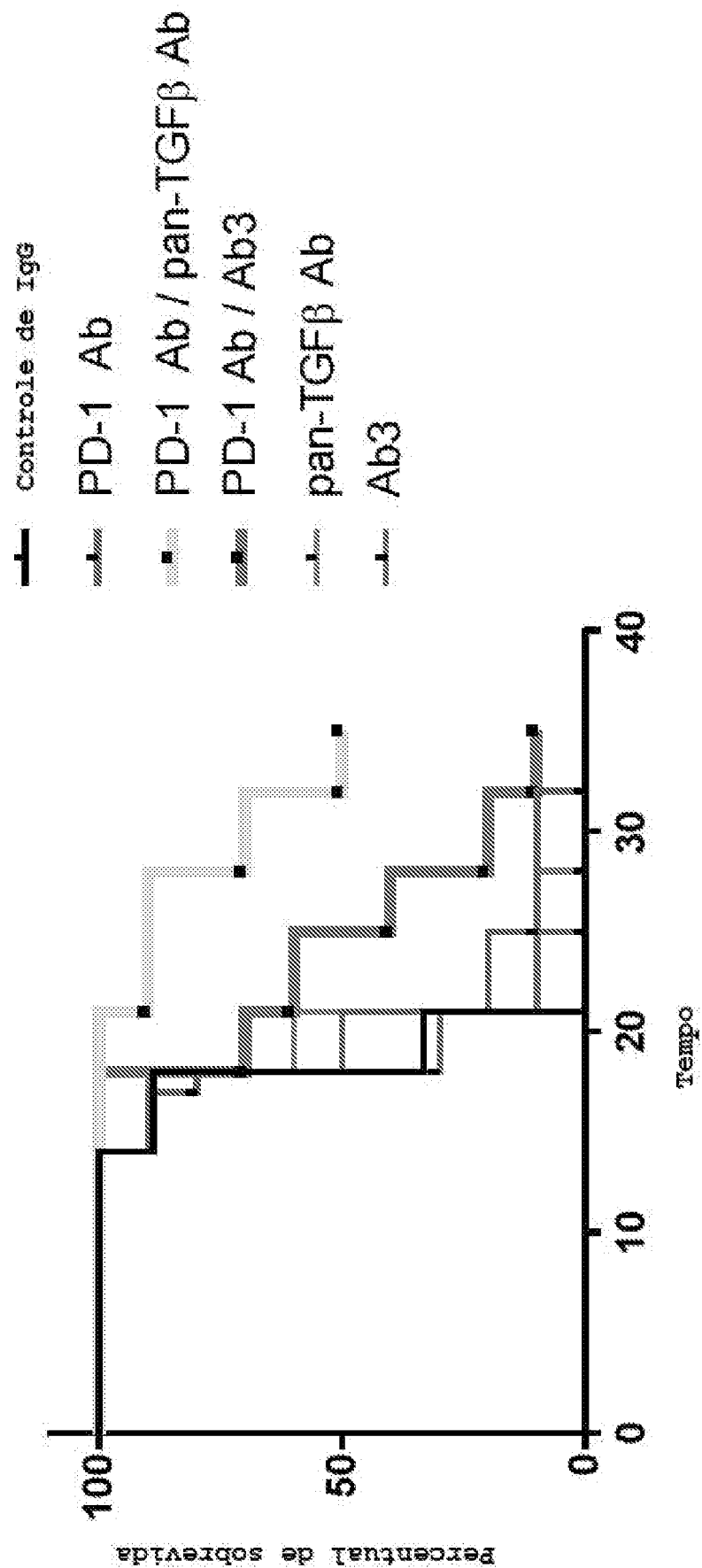


FIG. 18A

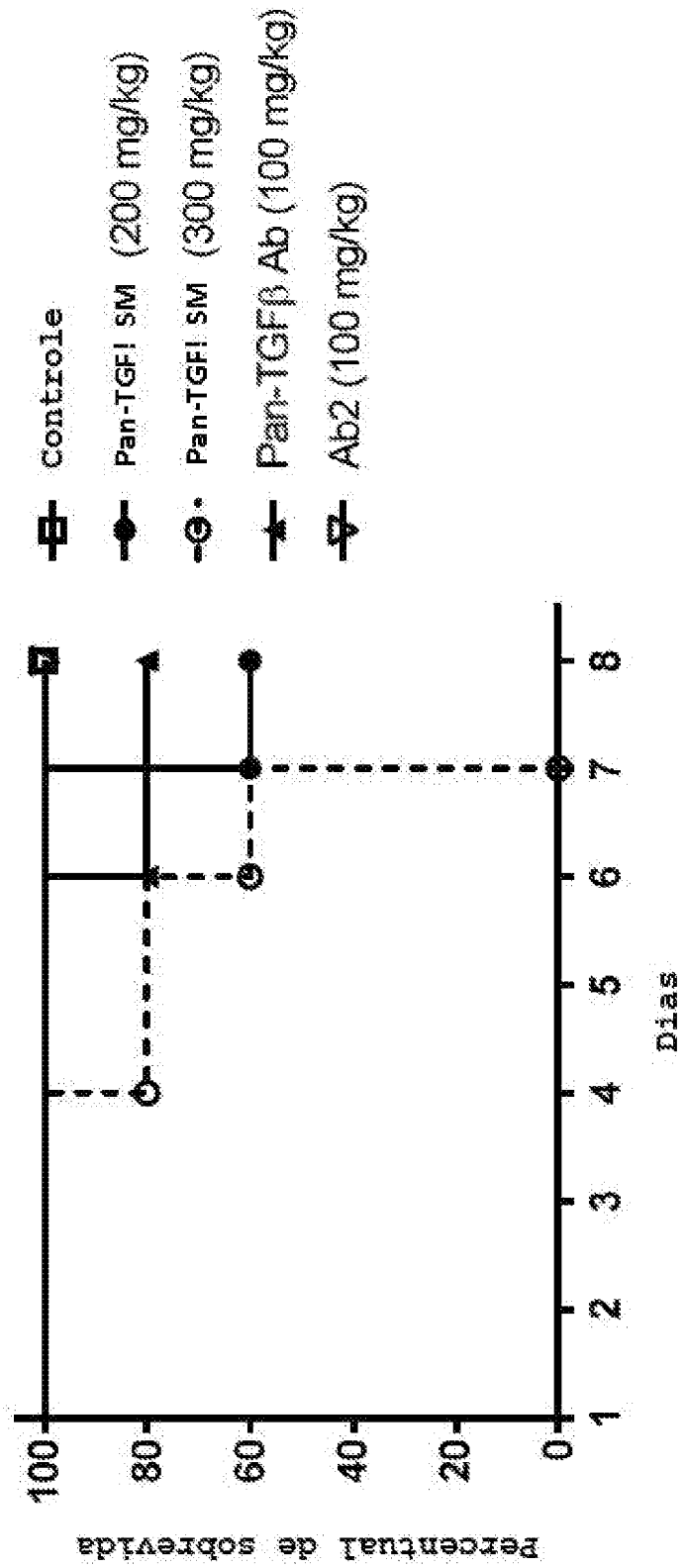


FIG. 18B

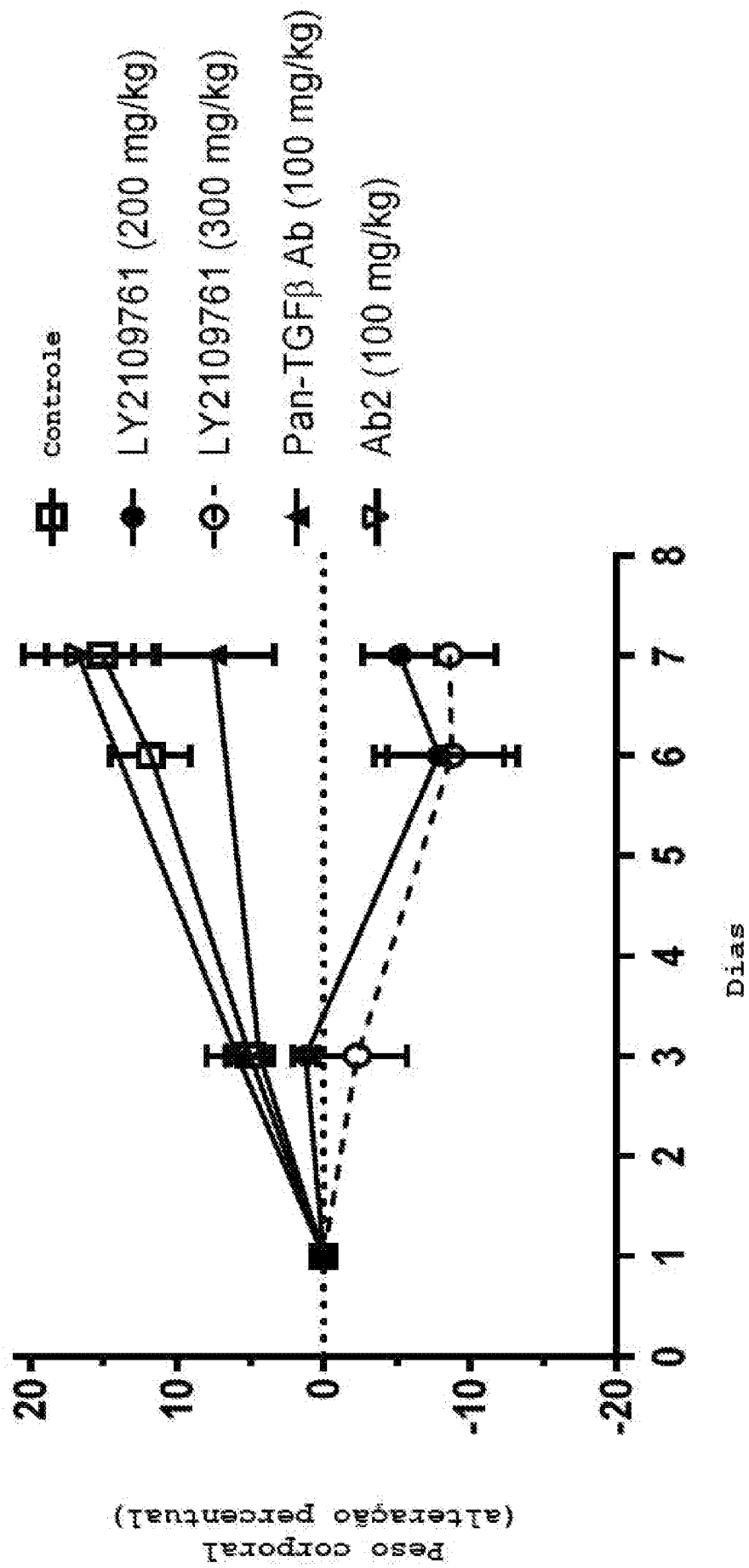


FIG. 18D

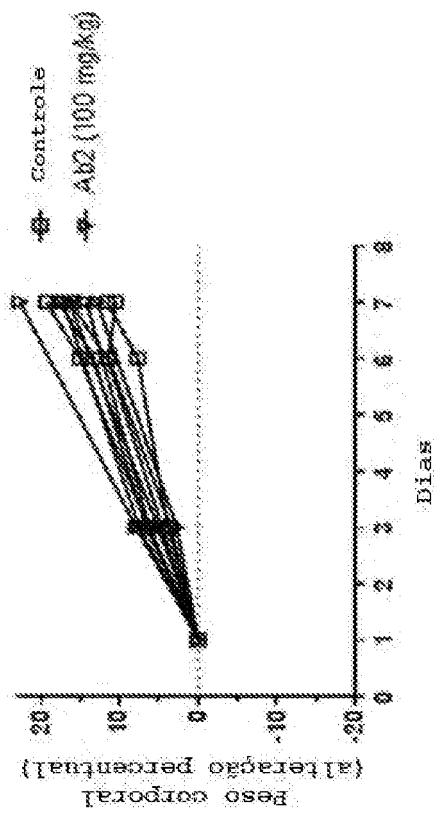


FIG. 18C

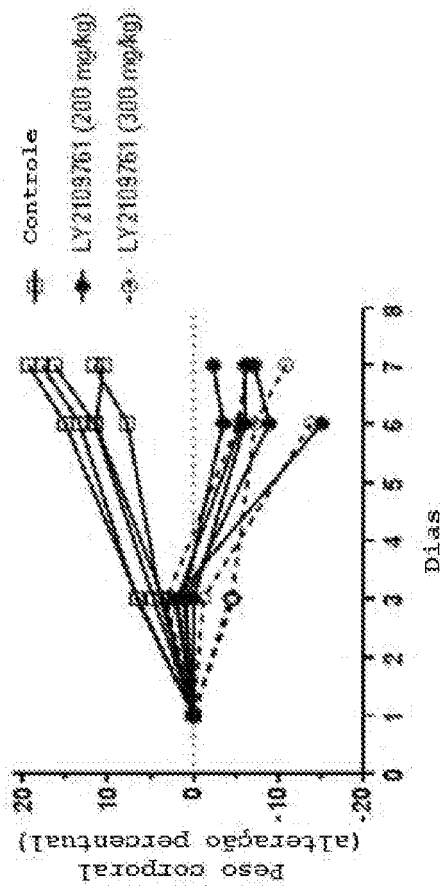


FIG. 18E

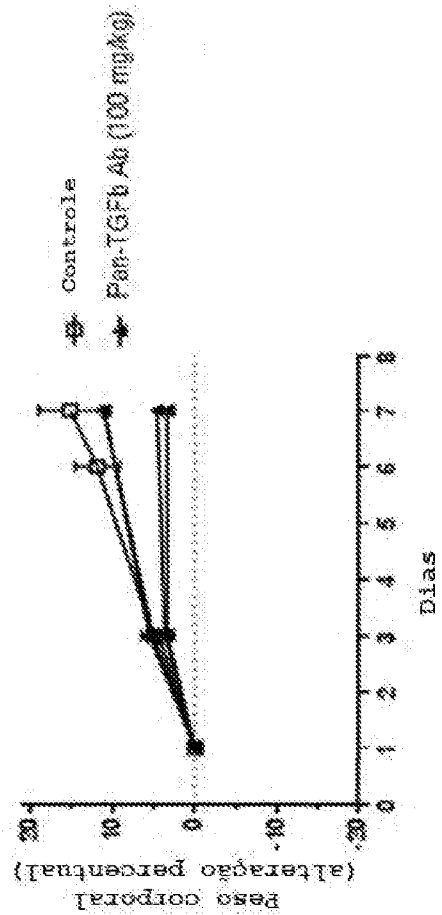
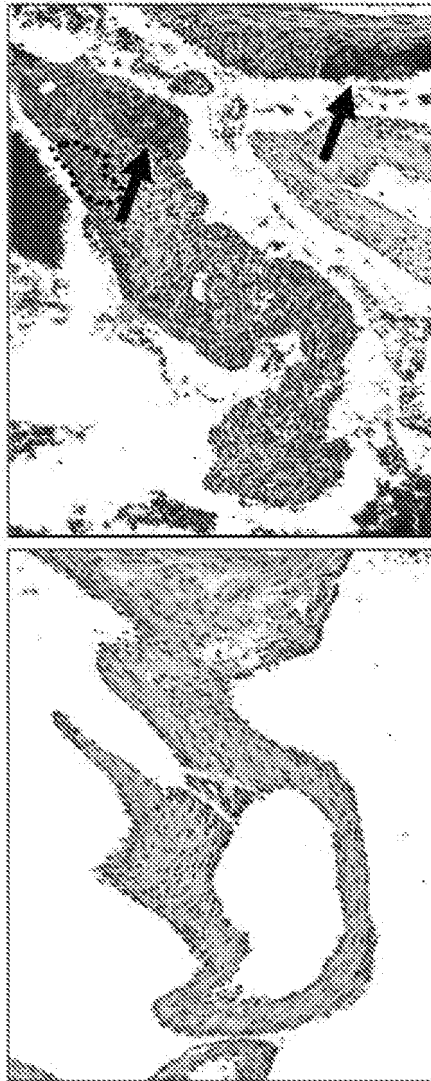


FIG. 18F

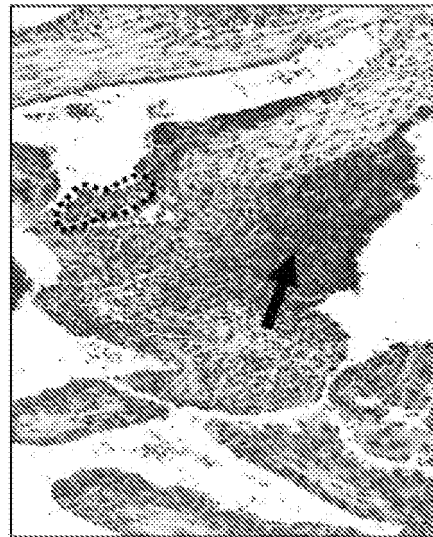
Válvula cardíaca (valvulopatia)

LY2109761 (200 mg/kg)

Não tratados



Pan-TGFb Ab (100 mg/kg)



Ab2 (100 mg/kg)



Hemorragia
↑
Hiperplasia
endotelial
○

FIG. 19A

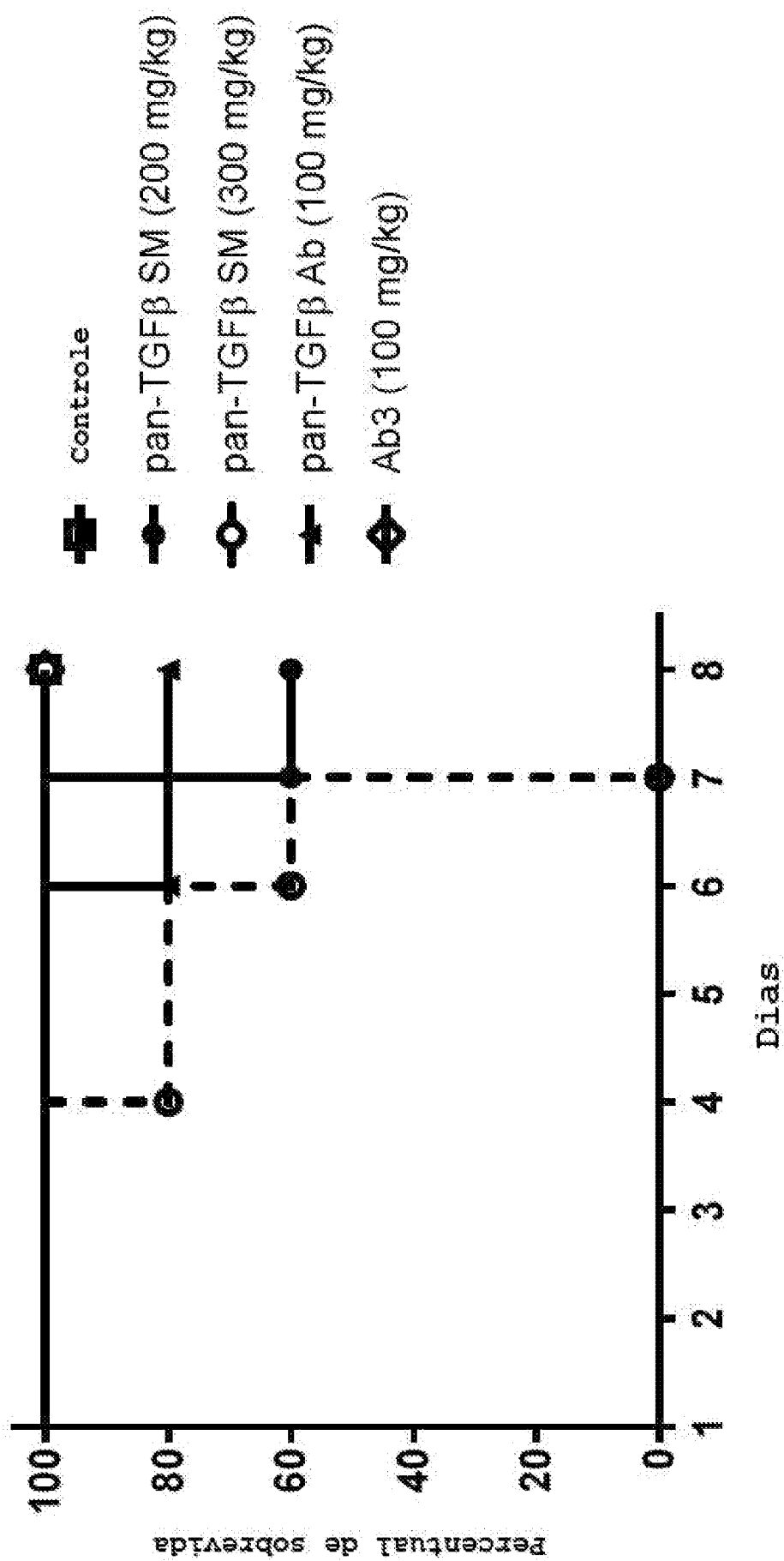


FIG. 19B

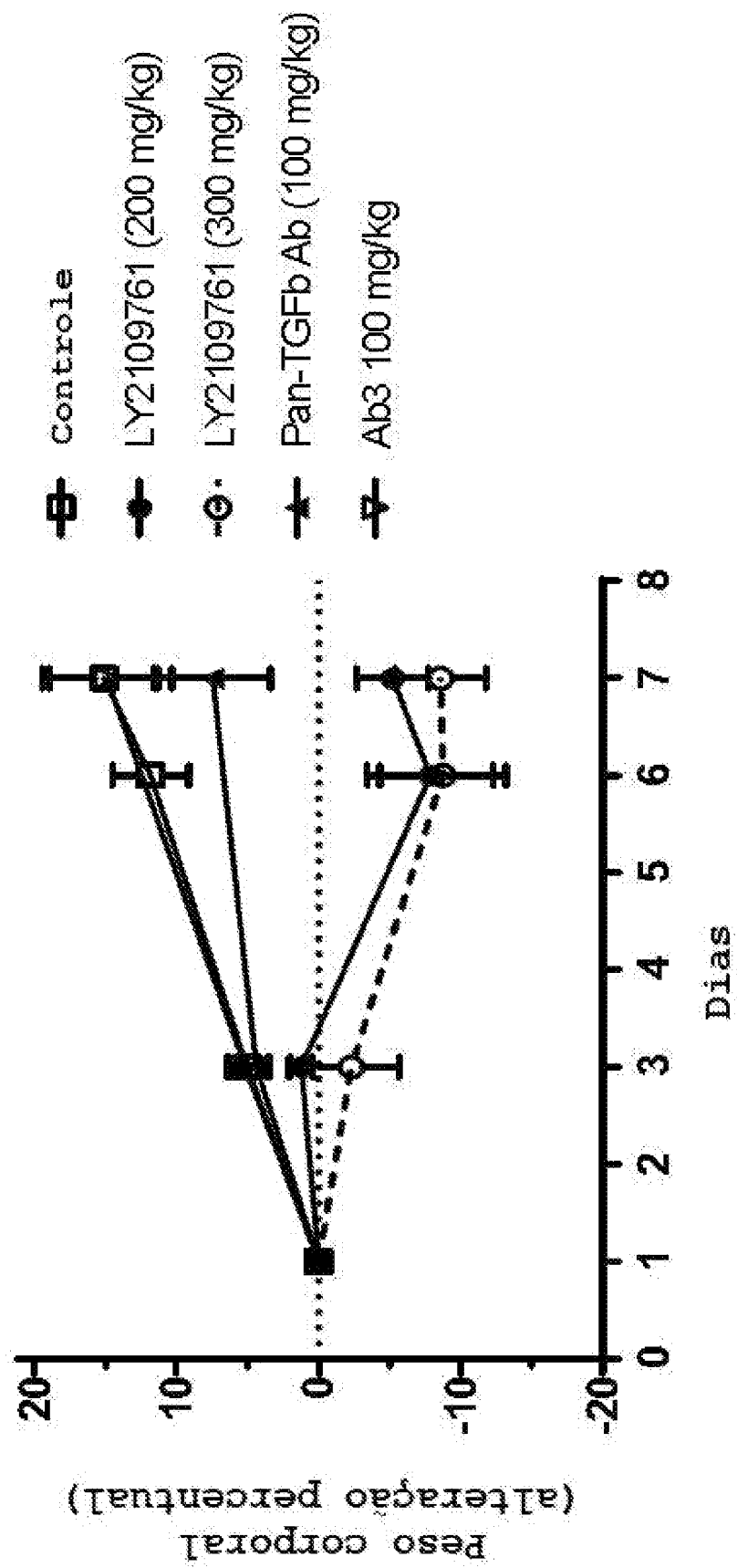


FIG. 20 Sinalização tônica de TGF β em células homeostáticas de BAL de rato.

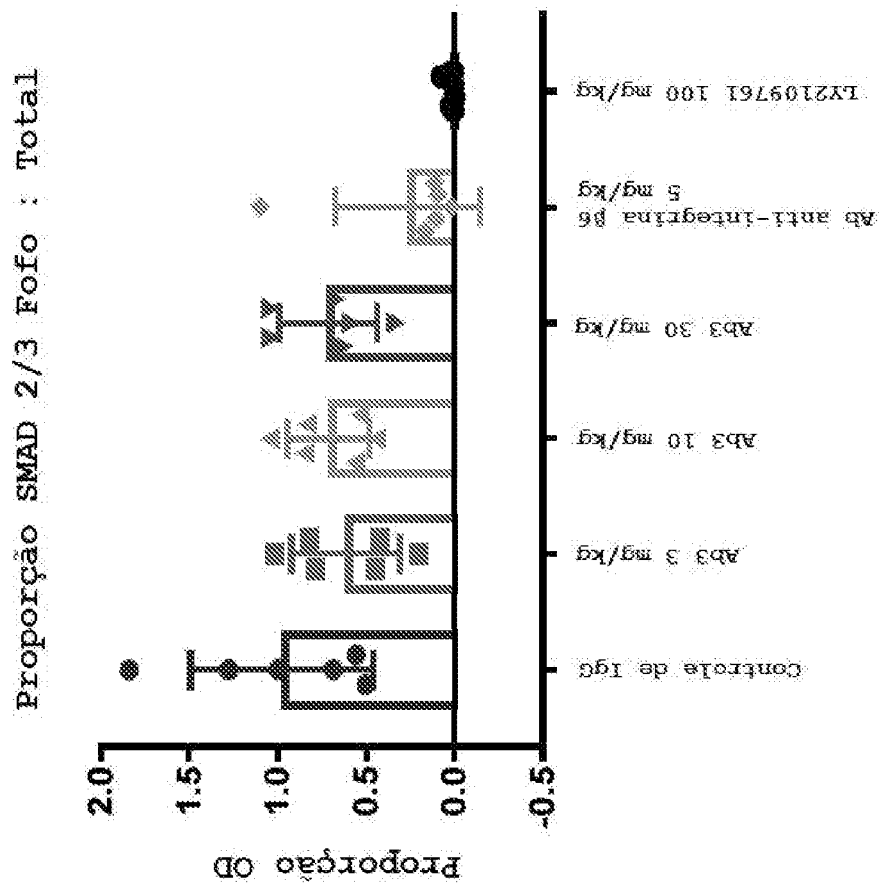
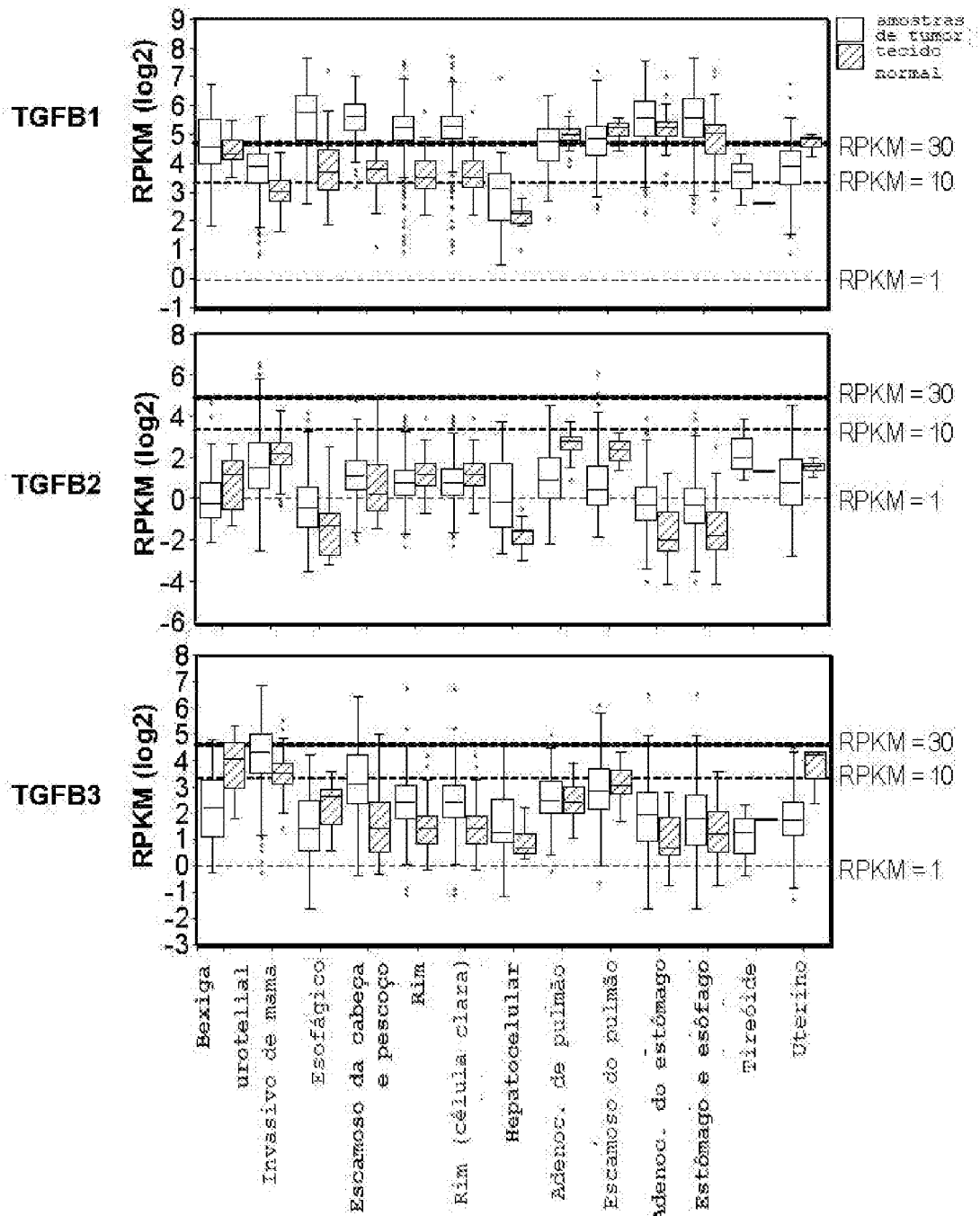


FIG. 21A Expressão de isoforma de FGF β vs. comparador normal (por tipo de câncer)



Indicações aprovadas para terapia de PD1/PDL1

FIG. 21B Percentagens de tumores que expressam isoformas de TGF β , por tipo de câncer

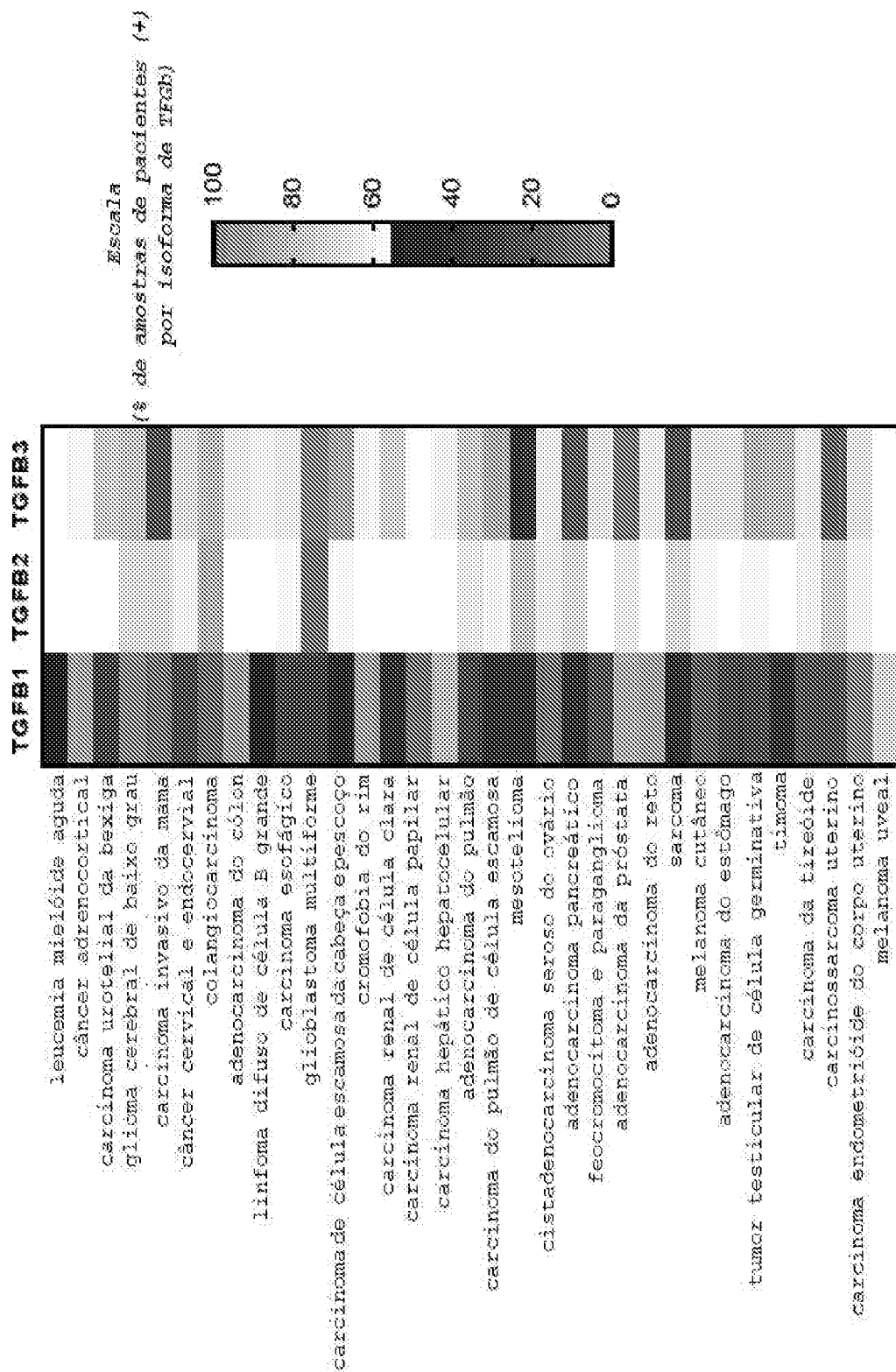


FIG. 21C Expressão de isoforma de TGFβ em amostras de tumores individuais, por tipo de câncer

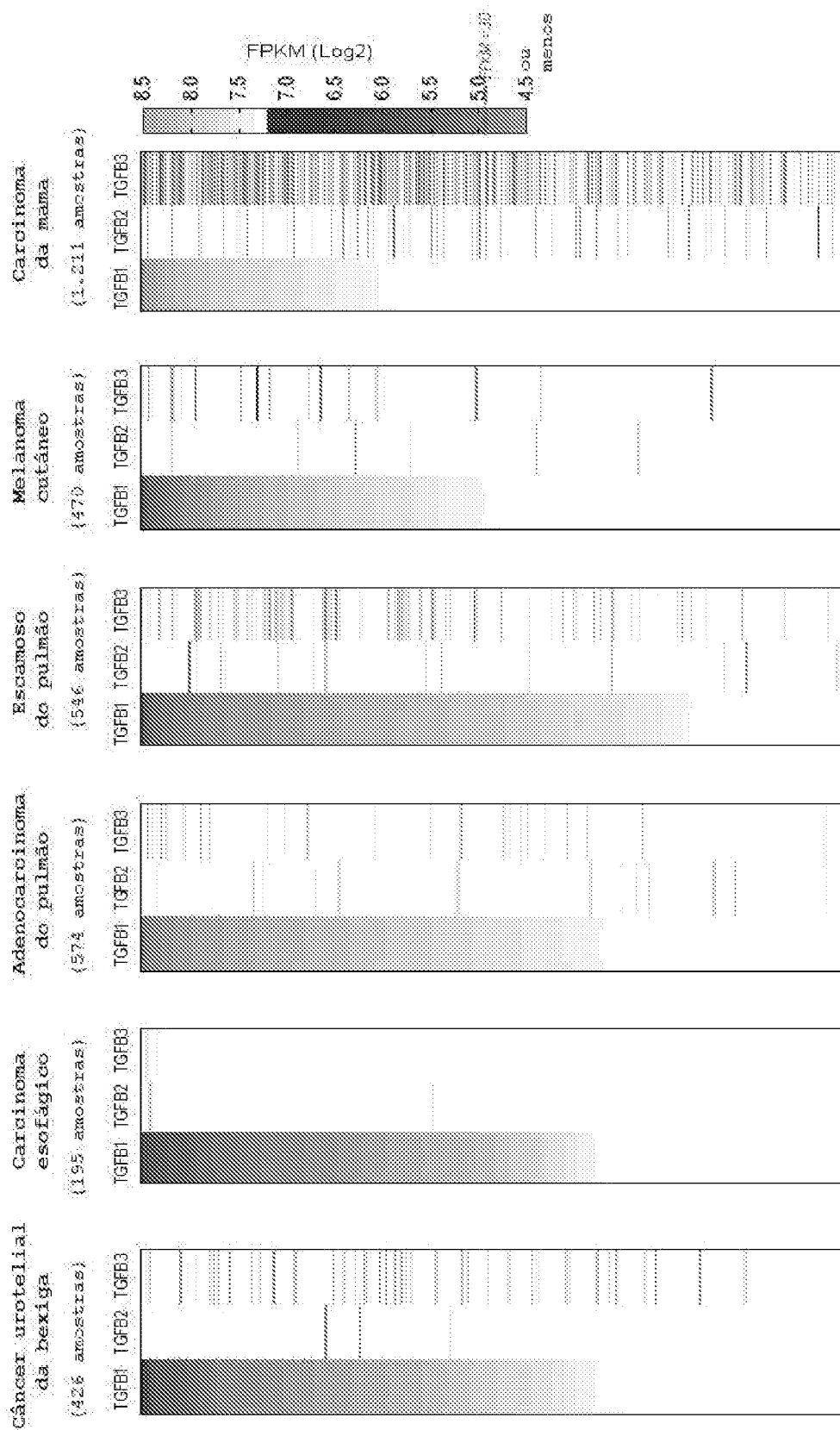


FIG. 21D Expressão de isoformas de TGF β em linhagens de modelo sintético de célula de câncer em camundongo

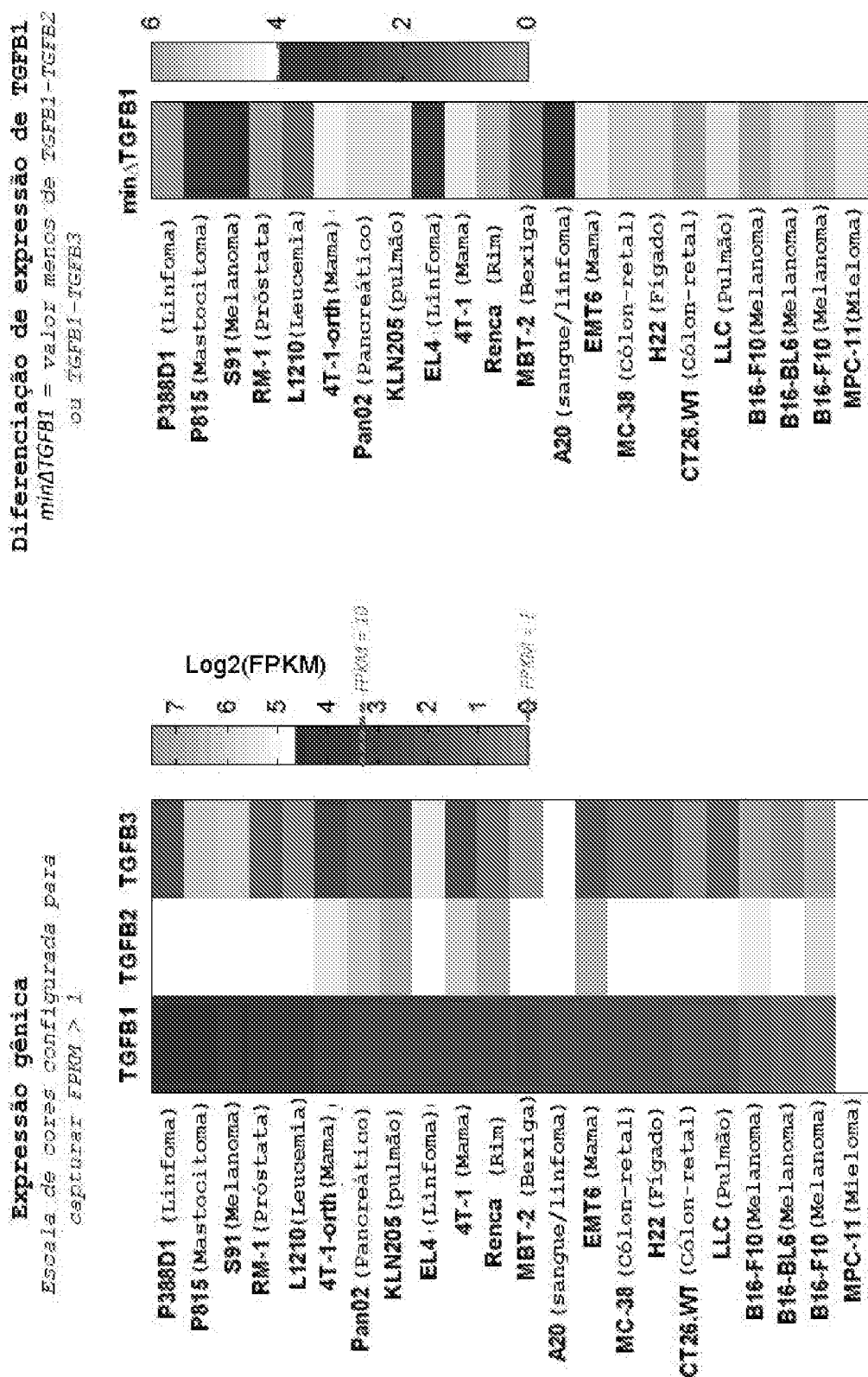
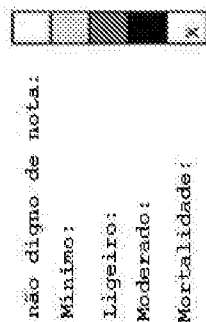


FIG. 22 Dados de pan-anticorpo contra TGF β de Estudo de segurança de 1 semana
Exemplo- coração, achados microscópicos

Artigo de teste	PBS					pan-TGF β Ab				
Dose (mg/kg)	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Animais/grupo	3					30				
Degeneração do miocárdio, necrose										
Hemorragia, miocárdio										
Hemorragia, válvula										
Hiperplasia, átrio										
Hiperplasia, endotélio da válvula										
Hiperplasia, estroma da válvula										
Infiltrado de células mistas, átrio										
Infiltrado de células mistas, base										
Infiltrado de células mistas, artéria coronária										
Infiltrado de células mistas, válvula										
Necrose com hemorragia, artéria coronária										
Necrose/infiltrado de células inflamatórias, cardiomiócito										
Valvulopatia										

Legenda:



RESUMO

**INIBIDORES DE TGF β 1 ISOFORMA-ESPECÍFICOS, CONTEXTO-
PERMISSIVOS, E SEUS USOS**

É revelado nesse relatório descritivo o uso terapêutico de inibidores de TGF β 1 isoforma-específicos, contexto-permissivos, no tratamento de doenças que envolvem desregulação de TGF β 1.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 201900917 LISTAGEM.txt
- Data de Geração do Código: 04/07/2019
- Hora de Geração do Código: 15:06:48
- Código de Controle:
 - Campo 1: 15471D80DDF512E3
 - Campo 2: 6414EE8B6A83E612