(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202190255 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.08.20

(22) Дата подачи заявки
2019.07.11

(51) Int. Cl. ***A61K 39/12*** (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(54) ВЫСОКОАФФИННЫЕ, СЕЛЕКТИВНЫЕ В ОТНОШЕНИИ ИЗОФОРМЫ ИНГИБИТОРЫ TGFβ1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/696,752; 62/718,196; 62/737,534; 62/758,180; 62/810,263; 62/827,552**
(32) **2018.07.11; 2018.08.13; 2018.09.27; 2018.11.09; 2019.02.25; 2019.04.01**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/041373**
(87) **WO 2020/014460 2020.01.16**

(71) Заявитель:
СКОЛАР РОК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Датта Абхишек, Капили Аллан, Шурпф Томас, Мартин Констанс, Дагбай Кевин Б., Чапрон Кристофер, Ваверсик Стефан, Литтлфилд Кристофер, Карвен Грегори Дж., Баклер Алан, Лин Сьюзан, Джексон Джастин В., Стейн Кейтлин, Авери Эндрю, Купер Энтони, Салотто Мэтью (US)

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

(57) В настоящем документе раскрыты моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, способные селективно ингибировать TGFβ1 с высокой эффективностью. Кроме того, раскрыты родственные композиции, способы и терапевтическое применение.

202190255 A1

202190255 A1

,ВЫСОКОАФФИННЫЕ, СЕЛЕКТИВНЫЕ В ОТНОШЕНИИ ИЗОФОРМЫ ИНГИБИТОРЫ TGFβ1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОПИСАНИЕ

Родственные заявки

[1] Согласно настоящей заявке испрашиваются преимущества и приоритет в соответствии с предварительными заявками на выдачу патента США №№ 62/696752, поданной 11 июля 2018 г.; 62/718196, поданной 13 августа 2018 г.; 62/737534, поданной 27 сентября 2018 г.; 62/758180, поданной 9 ноября 2018 г.; 62/810263, поданной 25 февраля 2019 г., и 62/827552, поданной 1 апреля 2019 г., каждая из которых имеет название «High-Affinity, Context-Independent TGFβ1 Inhibitors and Use Thereof» («Высокоаффинные, контекстно-независимые ингибиторы TGFβ1 и их применение»), содержание каждой из которых прямо включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Перечень последовательностей

[2] Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 11 июля 2019 г., называется 127036-03520_SL.txt и имеет размер 261252 байта.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[3] Трансформирующий фактор роста бета 1 (TGFβ1) является представителем суперсемейства факторов роста TGFβ, наряду с двумя другими структурно родственными изоформами, а именно TGFβ2 и TGFβ3, каждая из которых кодируется отдельным геном. Эти изоформы TGFβ действуют как плейотропные цитокины, которые регулируют пролиферацию, дифференцировку клеток, иммуномодуляцию (например, адаптивный иммунный ответ) и другие разнообразные биологические процессы как в гомеостазе, так и в контексте заболевания. Три изоформы TGFβ передают сигнал через одни и те же рецепторы на поверхности клетки и запускают сходные канонические события нижележащей передачи сигнала, которые включают в себя путь SMAD2/3. Однако исследования нокаута генов на мышах показывают различные фенотипы, позволяя предположить, что каждая изоформа играет особую роль in vivo. Частично это может быть достигнуто за счет различных профилей экспрессии трех изоформ.

[4] В иммунной системе Т-клетки распознаются как основная прямая мишень для TGFβ. Передача сигналов TGFβ важна для пролиферации эффекторных клеток, а также для регуляции дифференцировки эффекторных и регуляторных Т-клеток. Например, TGFβ является мощным супрессором эффекторных Т-клеток Th1 и Th2. Также было показано, что эффекторные функции цитотоксических Т-клеток подавляются TGFβ посредством множества механизмов. Более того, данные показывают, что другие типы клеток иммунной системы, такие как дендритные клетки, такие как клетки Лангерганса, и клетки-естественные киллеры (NK), также регулируются сигнальным путем TGFβ. Дисрегуляция TGFβ связано с рядом болезненных состояний, таких как рак, фиброз и иммунные нарушения.

[5] Многие биологические процессы, в которых играет роль внеклеточный матрикс, ассоциированы с передачей сигналов TGFβ. В частности, TGFβ участвует в заживлении ран, инвазии и метастазировании опухоли, а также в прогрессировании фиброза.

[6] По этим и другим причинам TGFβ стал привлекательной терапевтической мишенью для лечения иммунных нарушений, различных пролиферативных нарушений и фиброзных состояний. Однако наблюдения в доклинических исследованиях, в том числе на крысах и собаках, выявили серьезные токсические эффекты, ассоциированные с системным ингибированием TGFβ in vivo. Более того, хотя к настоящему времени разработано несколько ингибиторов TGFβ, большинство клинических программ, нацеленных на TGFβ, было прекращено из-за риска серьезных побочных эффектов (обобщенно представленных, например, в WO 2017/156500). Таким образом, несмотря на ряд прямых и косвенных доказательств, указывающих на участие передачи сигналов TGFβ в прогрессировании таких заболеваний, как рак и фиброз, на сегодняшний день на рынке нет доступных терапевтических средств TGFβ, которые считались бы безопасными и эффективными.

[7] Ранее заявитель настоящей заявки описал класс моноклональных антител, которые функционируют с новым механизмом действия для модуляции передачи сигналов фактора роста (см., например, WO 2014/182676). Эти антитела были разработаны для использования того факта, что TGFβ1 экспрессируется в виде латентного пропротеинового комплекса, состоящего из продомена и фактора роста, который требует стадии активации, которая высвобождает фактор роста из латентного комплекса. Вместо того, чтобы использовать традиционный подход непосредственного нацеленного воздействия на сам зрелый фактор роста после активации (такой как, нейтрализующие антитела), новый класс ингибирующих антител специфически нацелен на сам неактивный пропротеиновый комплекс, чтобы упреждающе блокировать стадию активации, предшествующую лиганд-

рецепторному взаимодействию. Было высказано предположение, что этот уникальный механизм действия должен обеспечивать преимущества для достижения как пространственных, так и временных преимуществ, поскольку они действуют в источнике, т.е. воздействуя на латентный комплекс proTGFβ1 в микроокружении заболевания до того, как произойдет активация.

[8] Используя этот подход, были созданы моноклональные антитела, которые специфически связываются и ингибируют стадию активации TGFβ1 (т.е. высвобождение зрелого фактора роста из латентного комплекса) селективным в отношении изоформы образом (см. WO 2017/156500). Данные, представленные в этом документе, подтверждают представление о том, что *специфическое в отношении изоформы* ингибирование (в отличие от *неселективного* ингибирования) TGFβ может привести к улучшенным профилям безопасности антагонизма TGFβ *in vivo*. Принимая это во внимание, заявитель настоящей заявки затем стремился разработать ингибиторы TGFβ1, которые являются как i) специфическими в отношении изоформы; так и ii) способными к широкому нацеленному воздействию на множественные сигнальные комплексы TGFβ1, которые ассоциированы с различными презентирующими молекулами, в качестве терапевтических средств для состояний, вызванных многогранными эффектами TGFβ1 и нарушением их регуляции.

[9] Такие антитела были впоследствии описаны в PCT/US2018/012601 (подана 5 января 2018 г.). Действительно, описанные в данном документе специфические в отношении изоформы ингибирующие средства были способны нацеленно воздействовать как на ассоциированный с ECM TGFβ1, так и на ассоциированный с иммунными клетками TGFβ1, тем самым блокируя *множественные источники* TGFβ1 во *множестве биологических контекстов*, сохраняя при этом специфичность в отношении изоформы. Были раскрыты данные из ряда моделей *in vivo*, демонстрирующие эффективность и безопасность селективных в отношении изоформы ингибиторов активации TGFβ1, демонстрируя, что такие ингибиторы являются применимыми для лечения заболеваний, в которые вовлечено дисрегуляция как ассоциированного с ECM TGFβ1, так и ассоциированного с иммунными клетками TGFβ1 in vivo.

[10] В то время как более ранняя работа, упомянутая выше, продемонстрировала применимость антител, способных нацеленно воздействовать на каждый из известных комплексов proTGFβ1 и ингибирующую активность, улучшенные селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 с еще более высокой активностью in vivo являются необходимыми.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

[11] В настоящем раскрытии предусмотрен новый класс высокоаффинных, селективных в отношении изоформы антител, способных ингибировать активацию TGFβ1 с высокой эффективностью. К ним относятся антитела (включая в себя иммуноглобулины и их антигенсвязывающие фрагменты или части, а также сконструированные молекулы, включающие в себя такие фрагменты), которые способны нацеливаться на множественные комплексы презентирующая молекула-proTGFβ1 (называемые «большие латентные комплексы» или «LLC») с высокими показателями аффинности. Эти антитела сохраняют превосходные профили селективности и безопасности, и показано, что они достигают улучшенной эффективности in vivo на множестве доклинических моделей с возможностью интерпретации полученных данных применительно к состояниям человека. Эти свойства ингибиторов TGFβ1 открывают возможности для разработки безопасных и эффективных терапевтических средств TGFβ1 для лечения заболеваний, связанных с дисрегуляцией TGFβ1.

[12] Следующие критерии отбора были приняты во внимание при создании антител к proTGFβ1 согласно настоящему раскрытию: 1) селективность в отношении изоформы; 2) высокие аффинности к LLC человека, например, LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1; 3) сильная ингибирующая способность; 4) благоприятные профили безопасности/токсикологии in vivo; и 5) эффективность in vivo на доклинической модели, которая воспроизводит заболевание человека. Кроме того, при оценке эффективности ингибиторов TGFβ1, используемых в качестве комбинированной терапии (например, дополнительной терапии), следует взвесить возможность достижения синергических эффектов (в отличие от простых аддитивных эффектов). Основываясь на этих критериях, авторы настоящего изобретения идентифицировали класс высокоаффинных моноклональных антител и их фрагментов, способных специфически нацеленно воздействовать на комплексы proTGFβ1 и эффективно блокировать активацию TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления новые антитела, раскрытые в настоящем документе, демонстрируют высокие аффинности ко всем целевым LLC (например, KD от наномолярного до субнаномолярного диапазона). Согласно предпочтительным вариантам осуществления такое антитело является несмещенным по отношению к различным комплексам proTGFβ1, так что антитело имеет эквивалентные аффинности ко всем целевым комплексам. Родственные композиции, терапевтическое применение, препараты, составы, процессы и способы предусмотрены настоящим изобретением.

[13] Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение включает в себя моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны связываться с каждым из следующих комплексов LLC человека с KD ≤ 10 нМ, как измерено с помощью титрования равновесного раствора: LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывается с каждым из комплексов LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ1 человека с KD ≤ 1 нМ. Предпочтительно антитело характеризуется KD ≤ 1 нМ для каждого из четырех LLC человека.

[14] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывается с лассо латентности или его частью proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент дополнительно связывает часть(и) домена фактора роста, такую(ие) как Finger-1 и Finger-2. Например, антитело или фрагмент могут связывать эпитоп, содержащий один или несколько аминокислотных остатков лассо латентности. Необязательно, эпитоп может дополнительно содержать один или несколько аминокислотных остатков домена фактора роста. Таким образом, такой эпитоп может являться комбинаторным эпитопом. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело не связывает свободный фактор роста TGFβ1, который не связан с комплексом proTGFβ1.

[15] Ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению являются функциональными антителами, поскольку они обладают ингибирующей активностью в отношении TGFβ1. Эффективность таких антител является специфической в отношении изоформы, что измеряют подходящими анализами активности in vitro, такими как клеточные репортерные анализы, описанные в настоящем документе. Таким образом, антитело не связывает и не ингибирует аналоги TGFβ2 или TGFβ3.

[16] Ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению способны блокировать высвобождение зрелого фактора роста из латентных комплексов LLC. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 могут ингибировать интегрин-зависимую активацию TGFβ1 и/или протеазозависимую активацию TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления протеаза представляет собой калликреин, плазмин или протеазу MMP. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 блокируют интегрин-зависимую активацию TGFβ1, не блокируя связывание интегрина с LLC.

[17] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению могут действовать посредством двойных ингибирующих способов действия в отношении ассоциированных с клетками LLC (например, GARP-

proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1). В одном механизме такие ингибиторы блокируют стадию активации TGFβ1, связанного с закрепленным на мембране GARP и/или LRRC33. Во втором механизме такие ингибиторы при связывании с мишенью могут индуцировать зависимую от антител интернализацию (следовательно, удаление) LLC с поверхности клетки, тем самым снижая передачу сигнала TGFβ1 в нише. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой pH-чувствительное антитело, отличающееся тем, что антитело связывается с комплексом proTGFβ1 с более высокой аффинностью при нейтральном значении pH, чем при кислом значении pH.

[18] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению эффективны для снижения экспрессии генов, ассоциированных с заболеванием, таких как TGFB1, Acta2, Col1a1, Col3a1, Fn1, Itga11, Lox, Loxl2, CCL2 и Mmp2.

[19] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению эффективны для снижения фосфорилирования нижележащего эффектора SMAD2/3 in vivo.

[20] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению эффективны для лечения показаний, связанных с TGFβ1. Такие показания включают в себя заболевания, связанные с аномальной экспрессией генов, заболевания, связанные с дисрегуляцией ECM, заболевания, характеризующиеся повышенным содержанием иммуносупрессивных клеток (например, Treg, MDSC и/или макрофаги M2), заболевания, связанные с мезенхимальным переходом, заболевания, связанные с протеазами, заболевания, связанные с аномальной пролиферацией и/или дифференцировкой стволовых клеток и т.д., хотя эти категории болезней не исключают друг друга. Согласно некоторым вариантам осуществления показание, связанное с TGFβ1, представляет собой пролиферативное нарушение, такое как миелопролиферативное нарушение и рак с солидной опухолью. Согласно некоторым вариантам осуществления показание, связанное с TGFβ1, представляет собой фиброзное нарушение, такое как фиброз органов. Рак может представлять собой распространенный рак, который включает в себя местнораспространенную опухоль/рак и метастатический рак.

[21] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению могут снижать количество популяций иммуносупрессивных клеток в очаге заболевания, таком как микроокружение опухоли и фиброзное микроокружение. Согласно некоторым вариантам осуществления популяции иммуносупрессивных клеток могут включать в себя M2-поляризованные макрофаги и/или MDSC.

[22] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению эффективны для достижения контроля над опухолью (например, частичного ответа и полного ответа), при этом опухоль необязательно относится к иммуносупрессивному фенотипу (например, фенотипу иммунного исключения). Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 могут достигать синергических противоопухолевых эффектов при использовании в сочетании с терапией рака, такой как терапия блокадой иммунных контрольных точек, химиотерапия и лучевая терапия. Терапия блокадой иммунных контрольных точек может предусматривать, например, антитело(а) к PD-(L)1. В такой комбинированной терапии ингибиторы TGFβ1 могут преодолевать устойчивость к лечению (например, первичную устойчивость), тем самым делая рак более восприимчивым к терапии рака. Таким образом, ингибиторы TGFβ1 можно использовать для лечения рака, характеризующегося иммуносупрессивной опухолью, у субъекта. Субъект может являться i) неответившим на первичную терапию рака, такую как ингибитор иммунной контрольной точки; или, ii) субъектом, у которого диагностирован рак, для лечения которого по меньшей мере один ингибитор иммунной контрольной точки одобрен регулирующим органом. Процент пациентов с объективным ответом (объединенное процентное отношение пациентов с частичным и полным ответом среди тех, кто получил терапию) для рака, для которого одобрен по меньшей мере один ингибитор иммунной контрольной точки, составляет менее 100%. Как правило, процент пациентов с объективным ответом составляет приблизительно 10-60%. Ингибиторы TGFβ1 могут увеличивать процент пациентов с объективным ответом среди популяции пациентов. Кроме того, в группе частичного ответа среди ответивших на первичную терапию пациентов ингибиторы TGFβ1 могут обеспечивать улучшенные клинические благоприятные эффекты. Согласно некоторым вариантам осуществления из группы ответивших на первичную терапию пациентов ингибиторы TGFβ1 могут снижать скорость приобретенной устойчивости к терапии рака. Иммуносупрессивная опухоль может представлять собой местнораспространенный рак/опухоль или метастатический рак. Согласно некоторым вариантам осуществления терапия рака может включать в себя, например, терапию ингибитором иммунных контрольных точек, химиотерапию и/или лучевую терапию.

[23] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению эффективны для достижения улучшения выживаемости у субъектов с солидной опухолью, где солидная опухоль необязательно представляет собой местнораспространенный или метастатический рак.

[24] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению эффективны для достижения долговременных противоопухолевых эффектов за счет индукции функции Т-клеток памяти. Таким образом, ингибиторы TGFβ1 могут снизить или отсрочить рецидив заболевания.

[25] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению эффективны для достижения противоопухолевых эффектов в опухолях, которые преимущественно экспрессируют TGFB1 и/или TGFb3. Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль, коэкспрессирующая TGFβ1 и TGFβ3, представляет собой карциному.

[26] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению способны преодолевать первичную устойчивость опухоли к терапии рака. Согласно некоторым вариантам осуществления такая опухоль инфильтрирована типами иммуносупрессивных клеток, такими как регуляторные Т-клетки, макрофаги М2-типа и/или супрессивные клетки миелоидного происхождения (MDSC). После лечения наблюдается уменьшение количества ассоциированных с опухолью иммуносупрессивных клеток и соответствующее увеличение количества противоопухолевых эффекторных Т-клеток.

[27] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению способствуют инфильтрации эффекторных клеток в опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления эффекторные клетки могут проникать в опухоль через сосудистую сеть опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению способствуют экспансии эффекторных клеток (например, пролиферации). Это может быть, по меньшей мере частично, опосредовано ингибированием GARP-положительных регуляторных Т-клеток.

[28] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению эффективны для лечения миелофиброза. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 обеспечивают антифиброзные эффекты костного мозга субъектов с миелофиброзом. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 эффективны для нормализации определенных гематологических параметров.

[29] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению эффективны для достижения антифиброзных эффектов in vivo. Антифиброзные эффекты могут включать в себя купирование развившегося фиброза, которое может представлять собой частичное или полное купирование.

[30] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению хорошо переносятся в доклинических исследованиях безопасности/токсикологии в дозах вплоть до 100, 200 или 300 мг/кг при еженедельной дозировке в течение по меньшей мере 4 недель. Такие исследования можно проводить на моделях с использованием животных, которые, как известно, чувствительны к ингибированию TGFβ, таких как крысы и не являющиеся человеком приматы. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению не вызывают наблюдаемой токсичности, ассоциированной с неселективным ингибированием TGFβ, такой как сердечно-сосудистая токсичность (например, вальвулопатия), эпителиальная гиперплазия и другие токсические эффекты, известные в настоящей области техники.

[31] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению достигают достаточного терапевтического окна при том, что эффективные количества ингибиторов, показанные в исследованиях эффективности in vivo, значительно ниже (например, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 6 раз или по меньшей мере в 10 раз) количеств или концентраций, вызывающих наблюдаемую токсичность. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтически эффективные количества ингибиторов составляют от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг в неделю.

Краткое описание графических материалов

[32] На фиг. **1** представлен график, на котором изображено ингибирование активации LTBP1-proTGFβ в анализе LN229.

[33] На фиг. **2** представлен график, на котором изображено ингибирование активации комплекса proTGFβ1 в анализе LN229.

[34] На фиг. **3** представлен график, на котором изображено ингибирование активации GARP-proTGFβ1 в анализе SW480β6.

[35] На фиг. **4** представлен график, на котором изображено ингибирование активации LRRC33-proTGFβ1 в анализе SW480β6.

[36] На фиг. **5A** представлены ингибирующие эффекты Ab3 и Ab6 на калликреин-индуцированную активацию TGFβ1 in vitro.

[37] На фиг. **5B** представлены ингибирующие эффекты Ab3 и Ab6 на плазмин-индуцированную активацию TGFβ1 in vitro.

[38] На фиг. **6** представлен график, изображающий быструю интернализацию LRRC33-proTGFb1 при связывании Ab6 в гетерологичных клетках, трансфицированных LRRC33 и proTGFβ1.

[39] На фиг. **7** представлены два графика, изображающие влияние Ab6 или Ab3 на экспрессию генов коллагена (Col1a1 и Col3a1) у мышей UUO. Мышей обрабатывали 3, 10 или 30 мг/кг/неделю Ab3 или 3 или 10 мг/кг/неделю Ab6. В качестве контроля использовали один IgG.

[40] На фиг. **8** представлены два графика, изображающие влияние Ab3 или Ab6 на экспрессию генов Fn1 и Loxl2 у мышей UUO. Мышей обрабатывали 3, 10 или 30 мг/кг/неделю Ab3 или 3 или 10 мг/кг/неделю Ab6. В качестве контроля использовали один IgG.

[41] На фиг. **9** обобщена статистическая значимость изменений экспрессии генов (по сравнению с UUO + IgG) после обработки в модели UUO.

[42] На фиг. **10** представлен график, который изображает процент выживаемости с течением времени (дни) в модели меланомы Cloudman S91 после введения Ab3 в дозе 30 мг/кг или 10 мг/кг в комбинации с антителом к PD-1. В качестве контроля использовали одно антитело к PD-1, антитело к SR-AB3.

[43] На фиг. **11A** представлены пять графиков, изображающих изменение роста опухоли (объем опухоли в $мм^3$), выраженное в виде медианного прогрессирования опухоли в модели меланомы Cloudman S91, измеренное с течением времени (дни) после введения Ab3 или Ab6 в дозе 30 мг/кг или 10 мг/кг, при этом каждое из них вводили в комбинации с антителом к PD-1. В качестве контроля использовали одно антитело к PD-1. Пунктирными линиями представлены животные, которых нужно было умертвить до достижения критериев конечной точки 2000 $мм^3$ вследствие изъязвления опухоли.

[44] На фиг. **11B** представлены два графика, изображающие медианные объемы опухоли Cloudman S91 в виде функции времени после введения Ab3 (слева) или Ab6 (справа) в дозе 30 мг/кг или 10 мг/кг в комбинации с антителом к PD-1. В качестве контролей использовали одно антитело к PD-1, одно Ab3, одно Ab6 и одно IgG.

[45] На фиг. **11C** представлено шесть графиков, изображающих изменения объема опухоли S91 в виде функции времени у мышей, обработанных (1) контролем IgG; (2) одним Ab6; (3) одним антителом к PD1; (4) одним антителом к PD1/Ab6 (3 мг/кг); (5) одним антителом кPD1/Ab6 (10 мг/кг); и (6) антителом к PD1/Ab6 (30 мг/кг). Конечный объем опухоли 2000 $мм^3$ указан верхней пунктирной линией; а 25% пороговый объем 500 $мм^3$ изображен нижней пунктирной линией. Ответившими на терапию считались те, кто достиг размера опухоли менее 25% от объема конечной точки.

[46] На фиг. **11D** представлены три графика, изображающие изменения объема опухоли S91 в зависимости от времени у мышей, обработанных комбинацией антитела к PD-1 и Ab6 при трех уровнях дозы (3, 10 и 30 мг/кг). После обработки продемонстрированы стойкие противоопухолевые эффекты.

[47] На фиг. **11E** представлен график, обобщающий данные, выраженные в виде медианного объема опухоли, на основании фиг. 11C.

[48] На фиг. **11F** представлен график, изображающий выживаемость животных в каждой экспериментальной группе с течением времени на основании фиг. 11C.

[49] На фиг. **12** представлен график, который изображает соотношения фосфорилированного и общего SMAD2/3 (pSMAD/SMAD) в модели рака мочевого пузыря MBT2. Животных обрабатывали следующим образом: (1) одним антителом к PD-1; (2) Ab5 (3 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1; (3) Ab5 (10 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1; (4) Ab3 (10 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1; (5) Ab3 (30 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1.

[50] На фиг. **13A** и **13B** представлены две группы из пяти графиков, которые изображают изменение роста опухоли MBT2 (объем опухоли в $мм^3$), измеренное с течением времени (дни) после введения Ab3 в дозе 30 мг/кг или 10 мг/кг, или Ab6 в дозе 3 мг/кг или 10 мг/кг в комбинации с антителом к PD-1. В качестве контроля использовали одно антитело к PD-1. Изменения объема опухоли в виде функции времени представлены на логарифмической шкале (фиг. **13A**) и на линейной шкале (фиг. **13B**). Пунктирными линиями представлены животные, которых нужно было умертвить до достижения критериев конечной точки 1200 $мм^3$ вследствие изъязвления опухоли.

[51] На фиг. **13C** представлены графики, изображающие медианные объемы опухоли в виде функции времени после введения Ab3 (вверху слева) в дозе 30 мг/кг или 10 мг/кг или Ab6 (вверху справа) в дозе 10 мг/кг или 3 мг/кг в комбинации с антителом к PD-1 в модели сингенного рака мочевого пузыря MBT2. В качестве контролей использовали одно антитело к PD-1, одно Ab3, одно Ab6 и одно IgG. Медианный объем опухоли на 15-й день представлен на нижнем графике.

[52] На фиг. **13D** представлено пять графиков, изображающих эффекты Ab6 в комбинации с антителом к PD-1 в модели сингенного рака мочевого пузыря MBT2. Ответившими на терапию считались те, кто достиг размера опухоли менее 25% от объема конечной точки в конце исследования.

[53] На фиг. **14** представлен график, который изображает процент выживаемости с течением времени (дни) после введения Ab3 в дозе 10 мг/кг или Ab6 в дозе 3 мг/кг или

10 мг/кг в комбинации с антителом к PD-1 в модели сингенного рака мочевого пузыря MBT2. В качестве контроля использовали одно антитело к PD-1.

[54] На фиг. **15** представлен ряд графиков, которые изображают изменение роста опухоли (объем опухоли в мм^3), измеренное с течением времени (дни) в исследовании с повторной провокацией опухоли. Животных, ранее обработанных антителом к PD-1/Ab3 или антителом к PD-1/Ab6, которые имели устраненные опухоли (пациенты с полным ответом, которые достигли полной регрессии), повторно провоцировали опухолевыми клетками MBT2. В качестве контроля использовали наивных необработанных животных. Пунктирными линиями представлены животные, которых нужно было умертвить до достижения критериев конечной точки 1200 мм^3 вследствие изъязвления опухоли.

[55] На фиг. **16** представлена тепловая карта, которая изображает, что связывание Ab5 Fab приводит к защите HDX в областях (область 1 и область 2) proTGFβ1.

[56] На фиг. **17** изображены области комплекса proTGFβ1, которые защищены от замены растворителя, измеренные с помощью HDX (см. фиг. 16) при связывании Ab5.

[57] На фиг. **18A** представляет собой тепловую карту, которая демонстрирует защитные эффекты связывания Fab Ab6 с proTGFβ1 (C4S). Области, затронутые взаимодействием антитело-антиген, обозначены красными прямоугольниками (1, 2a, 2b, 2c, 3, 4, 5a, 5b, 6a и 6b).

[58] На фиг. **18B** представлены данные HDX, наложенные на кристаллическую структуру TGFβ1. Изображены области, обозначенные на фиг. 18A.

[59] На фиг. **19A** изображена идентификация трех областей связывания (область 1, область 2 и область 3) после статистического анализа. Область 1 перекрывается с так называемым «лассо латентности» в продомене proTGFβ1, в то время как области 2 и 3 находятся внутри домена фактора роста.

[60] На фиг. **19B** изображены различные домены и мотивы proTGFβ1 по отношению к трем связывающим областям, участвующим в связывании Ab6. Также представлено выравнивание последовательностей трех изоформ.

[61] На фиг. **20A-20D** изображена относительная экспрессия РНК изоформ TGFβ в различных тканях и клетках. На фиг. **20A** изображена экспрессия изоформы TGFβ в различных раковых тканях человека по сравнению с нормальным компаратором (в зависимости от типа рака). На фиг. **20B** изображена частота экспрессии изоформы TGFβ в зависимости от типа рака человека на основании анализа более чем 10000 образцов 33 типов опухолей. На фиг. **20C** изображена экспрессия изоформы TGFβ в отдельных образцах опухолей в зависимости от типа рака. На фиг. **20D** изображена экспрессия изоформы TGFβ в мышиных модельных сингенных линиях раковых клеток.

[62] На фиг. **20E** предоставлено 4 панели экспрессии генов, изображающие, что все презентирующие молекулы (LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33) высоко экспрессируются в большинстве типов рака человека.

[63] На фиг. **20F** представлен анализ экспрессии генов TGFβ и родственных путей передачи сигналов на основании мышиных сингенных моделей опухолей, Cloudman S91, MBT-2 и EMT-6.

[64] На фиг. **20G** представлены три графика, сравнивающие экспрессию белков 3 изоформ TGFβ с помощью ELISA в моделях опухолей Cloudman S91, MBT-2 и EMT-6.

[65] На фиг. **20H** представлен график, сравнивающий уровень экспрессии РНК с помощью qPCR цельного лизата опухоли презентирующих молекул в моделях опухолей Cloudman S91, MBT-2 и EMT-6.

[66] На фиг. **21A** изображены результаты микроскопии сердца, полученные с помощью антитела ко всем формам TGFβ, в результате 1-недельного токсикологического исследования. На фиг. **21B** изображены результаты микроскопии сердца при исследовании Ab3 по сравнению с ингибитором ALK5 или антителом ко всем формам TGFβ, полученные в результате 4-недельного токсикологического исследования на крысах. На фиг. **21C** изображены результаты микроскопии при исследовании Ab6 по сравнению с ингибитором ALK5 или антителом ко всем формам TGFβ, полученные в результате 4-недельного токсикологического исследования на крысах.

[67] На фиг. **22** представлен график, изображающий медианные объемы опухоли S91 в виде функции времени. Комбинированные группы представляют собой селективные в отношении четырех различных изоформ контекстно-независимые ингибиторы TGFβ1 при двух уровнях доз, при этом каждый из них находится в комбинации с обработкой антителом к PD-1.

[68] На фиг. **23A-23B** представлены репрезентативные иммуногистохимические срезы опухолей S91, окрашенные CD8+ клеточным маркером. На фиг. **23A** представлен срез опухоли животного, обработанного одним антителом к PD-1. На фиг. **23B** представлен срез опухоли животного, обработанного как антителом к PD-1, так и иллюстративным контекстно-независимым ингибитором TGFβ1.

[69] На фиг. **24A-24D** представлены иллюстративные иммуногистохимические срезы опухолей S91, окрашенные маркерами макрофагов. На фиг. **24A** представлен срез опухоли животного, обработанного одним антителом к PD-1. На фиг. **24B** представлен срез опухоли животного, обработанного как антителом к PD-1, так и иллюстративным контекстно-независимым ингибитором TGFβ1. На фиг. **24C** представлен срез опухоли животного, обработанного антителом к PD-1 и Ab3 (30 мг/кг) с использованием антитела к

F4/80 в качестве маркера макрофагов. На фиг. **24D** представлен срез с использованием антитела к CD163 в качестве маркера макрофагов M2, демонстрирующий, что большинство клеток являются CD163-отрицательными.

[70] На фиг. **25** представлен график, который изображает кратное log2 изменение генов CD8+ Т-лимфоцитов (CD8α, перфорин и гранзим B) после 1-недельной обработки антителом к PD-1/Ab3 в опухолях MBT2 по сравнению с животными, обработанными одним антителом к PD-1.

[71] На фиг. **26A** представлены данные FACS, демонстрирующие индуцированное CD3/CD28 повышение регуляции GARP в периферических регуляторных Т-клетках человека.

[72] На фиг. **26B** представлен график, который изображает эффекты Ab3 или Ab6 в отношении опосредованного Treg ингибирования пролиферации Teff. В качестве контроля использовали IgG.

[73] На фиг. **27A** изображена стратегия гейтирования для сортировки субпопуляций Т-клеток в опухолях MBT2.

[74] На фиг. **27B** представлен ряд графиков, изображающих субпопуляции Т-клеток на 13-й день, выраженные в процентах CD45+ клеток.

[75] На фиг. **28A** представлена стратегия гейтирования для сортировки миелоидных субпопуляций в опухолях MBT2.

[76] На фиг. **28B** представлен ряд графиков, изображающих субпопуляции миелоидных клеток на 13-й день.

[77] На фиг. **28C** представлены данные FACS, демонстрирующие, что ассоциированные с опухолью макрофаги в MBT-2 экспрессируют LRRC33 на клеточной поверхности.

[78] На фиг. **28D** изображено, что MDSC, инфильтрирующие опухоль MBT-2, экспрессируют LRRC33 на клеточной поверхности.

[79] На фиг. **29A-29C** представлены дополнительные анализы данных FACS, демонстрирующие эффекты обоаботки Ab6 и антителом к PD-1 в опухолях MBT2.

[80] На фиг. **30A-30D** представлены изображения IHC иллюстративных срезов опухоли MBT2, изображающие внутриопухолевые CD8-положительные Т-клетки.

[81] На фиг. **30E** представлена количественная оценка данных IHC на основе Фиг. 30A-30D, выраженная в виде доли CD8-положительных клеток в каждой обработанной группе. Некротические участки срезов были исключены из анализа.

[82] На фиг. **30F** представлены иммуногистохимические анализы эффекта обработки Ab6 и антителом к PD-1 в опухолях MBT2. Срезы опухоли визуализировали в

отношении фосфо-SMAD3 (верхние панели) или CD8 и CD31 (нижние панели) у животных из трех изображенных групп обработки.

[83] На фиг. **30G** представлены данные, демонстрирующие, что Ab6 и антитело к PD-1 в комбинации, по-видимому, запускают мобилизацию CD8+ Т-клеток и инфильтрацию в опухолях MBT2 из CD31+ сосуда.

[84] На фиг. **31A-31D** представлена экспрессия генов маркеров иммунного ответа, Ptprc (фиг. **31A**); CD8a (фиг. **31B**); CD4 (фиг. **31C**) и Foxp3 (фиг. **31D**), собранных из опухолей MBT2 из 4 изображенных групп обработки.

[85] На фиг. **32A-32C** представлена экспрессия генов маркеров эффекторной функции, Ifng (фиг. **32A**); Gzmb (фиг. **32B**); и Prf1 (фиг. **32C**) на указанные 10-й день и/или 13-й день.

[86] На фиг. **32D** представлен ряд графиков, изображающих экспрессию четырех маркеров генов (гранзим B, перфорин, IFNγ и Klrk1), измеренную с помощью qPCR в образцах опухоли MBT2 на 10-й день. На каждом графике изображено кратное изменение экспрессии в трех группах обработки: одно антитело к PD-1 (слева); одно Ab6 (в центре); и комбинация антитела к PD-1 и Ab6 (справа).

[87] На фиг. **33A** изображено связывание Ab6 in vitro с изображенными четырьмя большими латентными комплексами, измеренное с помощью анализа на основе равновесного титрования раствора (MSD-SET). Измеренные значения K_D (в пикомолях) изображены справа.

[88] На фиг. **33B** изображен анализ активности на основе клеток LN229 и предоставлен график, изображающий зависимую от концентрации активность Ab6 в отношении указанных четырех больших латентных комплексов. Также изображено, что Ab6 не ингибирует proTGFβ3.

[89] На фиг. **34A** представлен ряд из девяти графиков, изображающих эффект Ab6 в комбинации с антителом к PD1 и/или антителом к TGFβ3 или без них в отношении роста/регрессии опухоли с течением времени в EMT6 (исследование 1). Верхняя пунктирная линия на каждом графике представляет конечный объем опухоли 2000 мм^3, а нижняя пунктирная линия на каждом графике представляет 25% конечного объема (т.е., 500 мм^3).

[90] На фиг. **34B** представлен график, изображающий процент выживаемости с течением времени (дни после начала обработки) в EMT6 (исследование 1). Группы обработки, которые включали как антитела к PD-1, так и Ab6, продемонстрировали значительное улучшение выживаемости по сравнению с одним антителом к PD-1.

[91] На фиг. **34C** предоставлены данные, изображающие процент выживаемости с течением времени (дни после начала обработки) в EMT6 (исследование 2). Группы обработки, которые включают как антитело к PD-1, так и Ab6, продемонстрировали значительное улучшение выживаемости по сравнению с одним антителом к PD-1, и противоопухолевые эффекты сохраняются после окончания обработки.

[92] На фиг. **34D** представлены эффекты комбинации антитела к PD-1 и Ab6 в отношении выживаемости в модели рака молочной железы EMT6.

[93] На фиг. **35** представлены два графика, изображающие относительную экспрессию трех изоформ TGFβ в опухолях EMT6, измеренную по уровням мРНК (слева) и уровням белка (справа).

[94] На фиг. **36A** представлен ряд гистологических изображений, изображающих окрашивание ретикулина серебром в качестве маркера фиброзного фенотипа костного мозга в модели мышиного миелопролиферативного нарушения.

[95] На фиг. **36B** представлены два графика, изображающие гистопатологический анализ фиброза костного мозга и эффект ингибирования TGFβ1 у мышей MPL^{W515L} с высоким бременем заболевания на основании двух отдельных повторных исследований.

[96] На фиг. **36C** представлен ряд графиков, изображающих гематологические параметры у мышей MPL^{W515L}, обработанных Ab6 или контрольным IgG.

[97] На фиг. **36D** представлен ряд графиков, изображающих дополнительные гематологические параметры у мышей MPL^{W515L}, обработанных Ab6 или контрольным IgG.

[98] На фиг. **37A** представлен анализ изменения набора генов (GSVA), демонстрирующий корреляцию между экспрессией изоформ TGFβ и набором генов IPRES.

[99] На фиг. **37B** представлен анализ изменения набора генов (GSVA), демонстрирующий корреляцию между экспрессией изоформ TGFβ и набором генов Plasari. Экспрессия изоформы TGFb1 коррелирует с активацией пути TGFβ. Набор генов TGFβ-чувствительных генов Plasari значимо и сильно коррелирует с экспрессией изоформы РНК TGFb1 во многих типах опухолей, аннотированных TCGA. Имеет место корреляция мРНК TGFB1 и сигнальной сигнатуры TGFβ.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Определения

[100] Для облегчения понимания настоящего раскрытия сначала представлены определения некоторых терминов. Эти определения следует толковать в свете оставшейся части раскрытия, и так, как их понимает специалист в настоящей области техники. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе,

имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в настоящей области техники. Дополнительные определения приведены в подробном раскрытии.

[101] *Распространенный рак, распространенная злокачественная опухоль:* Используемый в настоящем документе термин «распространенный рак» или «распространенная злокачественная опухоль» имеет значение, понятное в соответствующей области техники, например, как понимается онкологами в контексте диагностики или лечения субъектов/пациентов с раком. Распространенное злокачественное новообразование с солидной опухолью может являться *местнораспространенным* или *метастатическим*. Термин «местнораспространенный рак» используется для описания рака (например, опухоли), который вырос за пределами органа, в котором он возник, но еще не распространился на отдаленные части тела. Таким образом, этот термин включает в себя рак, который распространился от того места, где он начался, на близлежащие ткани или лимфатические узлы. Напротив, «метастатический рак» представляет собой рак, который распространился из той части тела, где он возник (первичный очаг), в другие части (например, отдаленные части) тела.

[102] *Аффинность:* Аффинность представляет собой силу связывания молекулы (такой как антитела) с ее лигандом (таким как антиген). Как правило, ее измеряют и записывают в виде константы равновесной диссоциации (K_D). В контексте взаимодействий антитело-антиген, K_D представляет собой отношение скорости диссоциации антитела (K_{off}), как быстро оно диссоциирует от своего антигена, к скорости ассоциации антитела (K_{on}) антитела, насколько быстро оно связывается со своим антигеном. Например, антитело с аффинностью $\leq$ 5 нМ имеет значение K_D, равное 5 нМ или ниже (т.е. аффинность 5 нМ или выше), определенное с помощью подходящего анализа связывания in vitro. Подходящие анализы in vitro можно использовать для измерения значений KD антитела для его антигена, такие как биослойная интерферометрия (BLI) и титрование равновесного раствора (например, MSD-SET).

[103] *Антитело:* Термин «антитело» охватывает любой встречающийся в природе, рекомбинантный, модифицированный или сконструированный иммуноглобулин или иммуноглобулиноподобную структуру, или его антигенсвязывающий фрагмент, или его часть, или их производное, как дополнительно описано в другом месте в настоящем документе. Таким образом, термин относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном-мишенью, и включает в себя, например, химерные, гуманизированные, полностью человеческие и биспецифические антитела. Интактное антитело, как правило, будет содержать по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, но в некоторых случаях может включать в себя

меньше цепей, такие как антитела, встречающиеся в природе у верблюдовых, которые могут содержать только тяжелые цепи. Антитела могут быть получены исключительно из одного источника или могут являться «химерными», т.е. разные части антитела могут происходить из двух разных антител. Антитела или их антигенсвязывающие части могут быть получены в гибридомах методами рекомбинантной ДНК или ферментативным или химическим расщеплением интактных антител. Используемый в настоящем документе термин «антитела» включает в себя моноклональные антитела, биспецифические антитела, миниантитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в настоящем документе «миметики антител»), химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слитые антитела (иногда упоминаемые в настоящем документе как «конъюгаты антител») соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления термин также включает в себя «пептитела».

[104] *Антиген:* Термин «антиген» в широком смысле включает в себя любые молекулы, содержащие антигенную детерминанту в области(ях) связывания, с которой(ыми) специфически связывается антитело или фрагмент. Антиген может представлять собой одноэлементную молекулу (такую как мономер или фрагмент белка) или комплекс, состоящий из нескольких компонентов. Антиген обеспечивает эпитоп, например, молекулу или часть молекулы, или комплекс молекул или частей молекул, способных связываться селективным связывающим средством, таким как антигенсвязывающий белок (включая в себя, например, антитело). Таким образом, селективное связывающее средство может специфически связываться с антигеном, который образован двумя или более компонентами в комплексе. Согласно некоторым вариантам осуществления антиген может использоваться у животного для выработки антител, способных связываться с этим антигеном. Антиген может обладать одним или несколькими эпитопами, которые способны взаимодействовать с различными антигенсвязывающими белками, например антителами. В контексте настоящего описания подходящий антиген представляет собой комплекс (например, мультимерный комплекс, состоящий из множества компонентов в ассоциации), содержащий димер proTGF в ассоциации с презентирующей молекулой. Каждый мономер димера proTGF содержит продомен и домен фактора роста, разделенные последовательностью расщепления фурином. Два таких мономера образуют димерный комплекс proTGF (см. фиг. 19). Он, в свою очередь, ковалентно связан с презентирующей молекулой посредством дисульфидных связей, в которые вовлечен остаток цистеина, присутствующий около N-конца каждого мономера proTGF. Этот мультикомплекс, образованный димером proTGF, связанным с презентирующей молекулой, как правило, называют большим латентным

комплексом. Антигенный комплекс, подходящий для скрининга антител или антигенсвязывающих фрагментов, например, включает в себя компонент презентирующей молекулы большого латентного комплекса. Такой компонент презентирующей молекулы может являться полноразмерной презентирующей молекулой или ее фрагментом(ами). Минимально необходимые части презентирующей молекулы, как правило, содержат по меньшей мере 50 аминокислот, но более предпочтительно по меньшей мере 100 аминокислот полипептида презентирующей молекулы, который содержит два остатка цистеина, способных образовывать ковалентные связи с димером proTGFβ1.

[105] *Антигенсвязывающая часть/фрагмент:* Используемые в настоящем документе термины «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающий фрагмент» антитела относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, TGFβ1). Антигенсвязывающие части включают в себя без ограничения любые встречающийся в природе, полученный ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связываются с антигеном с образованием комплекса. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающая часть антитела может быть получена, например, из полных молекул антитела с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной генной инженерии, включающие в себя манипуляции с ДНК и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и необязательно константные домены. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих частей включают в себя следующее: (i) фрагменты Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагменты F(ab')2, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагменты Fd, состоящие из доменов VH и CH1; (iv) фрагменты Fv, состоящие из доменов VL и VH одного плеча антитела; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv) (см., например, Bird et al. (1988) SCIENCE 242:423-426; и Huston et al. (1988) PROC. NAT'L. ACAD. SCI. USA 85:5879-5883); (vi) фрагменты dAb (см., например, Ward et al. (1989) NATURE 341: 544-546); и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR)). Кроме того, предусмотрены другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела. Термин антигенсвязывающая часть антитела включает в себя «одноцепочечный Fab-фрагмент», иначе известный как «scFab», содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела (VH), константный домен 1 антитела (CH1), вариабельный домен легкой цепи антитела.

(VL), константный домен легкой цепи (CL) антитела и линкер, причем указанные домены антитела и указанный линкер характеризуются одним из следующих порядков в направлении от N-конца к C-концу: a) VH-CH1-линкер-VL-CL, b) VL-CL-линкер-VH-CH1, c) VH-CL-линкер-VL-CH1 или d) VL-CH1-линкер-VH-CL; и где указанный линкер представляет собой полипептид, состоящий по меньшей мере из 30 аминокислот, предпочтительно от 32 до 50 аминокислот.

[106] *Смещение:* В контексте настоящего раскрытия термин «смещение» относится к перекосу или неравномерной аффинности к или по отношению к подмножеству антигенов, с которыми антитело способно специфически связываться. Например, считается, что антитело характеризуется смещением, если аффинность к одному комплексу антигена и аффинность к другому комплексу антигена не эквивалентны. Контекстно-независимые антитела в соответствии с настоящим раскрытием обладают эквивалентной аффинностью к таким комплексам антигенов (т.е. несмещенной аффинностью).

[107] *Область связывания:* Используемый в настоящем документе термин «связывающая область» представляет собой часть антигена, которая при связывании с антителом или его фрагментом может образовывать границу взаимодействия антитело-антиген. После связывания антитела область связывания становится защищенной от воздействия на поверхность, что может быть обнаружено подходящими методами, такими как HDX-MS. Взаимодействие антитело-антиген может быть опосредовано несколькими (например, двумя или более) областями связывания. Область связывания может содержать антигенную детерминанту или эпитоп.

[108] *Биослойная интерферометрия (BLI):* BLI представляет собой технологию без меток для оптического измерения биомолекулярных взаимодействий, например, между лигандом, иммобилизованным на поверхности наконечника биосенсора, и аналитом в растворе. BLI обеспечивает возможность точного и аккуратного мониторинга специфичности связывания, скорости ассоциации и диссоциации или концентрации. Инструменты платформы BLI коммерчески доступны, например, от ForteBio и обычно называются системой Octet®.

[109] *Рак:* используемый в настоящем документе термин «рак» относится к физиологическому состоянию многоклеточных эукариот, которое, как правило, характеризуется нерегулируемой пролиферацией клеток и злокачественными новообразованиями. Этот термин в широком смысле включает в себя солидные злокачественные новообразования и гемобластозы, включая в себя опухоли, рак крови (например, лейкозы, лимфомы и миеломы), а также миелофиброз.

[110] *Ассоциированный с клеткой proTGFβ1:* Термин относится к TGFβ1 или его сигнальному комплексу (например, про/латентный TGFβ1), который связан с мембраной (например, привязан к поверхности клетки). Как правило, такая клетка представляет собой иммунную клетку. TGFβ1, который презентируется с помощью GARP или LRRC33, представляет собой ассоциированный с клеткой TGFβ1. GARP и LRRC33 представляют собой трансмембранные презентирующие молекулы, которые экспрессируются на клеточной поверхности определенных клеток. GARP-proTGFβ1 и LRRC33- вместе могут называться «ассоциированными с клеткой» (или «ассоциированными с клеточной поверхностью») комплексами proTGFβ1, которые опосредуют клеточную proTGFβ1-ассоциированную (например, ассоциированную с иммунными клетками) активацию/передачу сигналов TGFβ1. Термин также включает в себя рекомбинантные очищенные комплексы GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1 в растворе (например, анализы in vitro), которые физически не прикреплены к клеточным мембранам. Средние значения KD антитела (или его фрагмента) к комплексу GARP-proTGFβ1 и комплексу LRRC33-proTGFβ1 можно рассчитать для совокупного представления аффинностей к ассоциированным с клетками (например, ассоциированным с иммунными клетками) комплексам proTGFβ1. См., например, таблицу 8, столбец (G). Человеческий аналог презентирующей молекулы или комплекса презентирующей молекулы может обозначаться буквой «h» перед белком или белковым комплексом, например, «*h*GARP», «*h*GARP-proTGFβ1», «*h*LRRC33» и «*h*LRRC33-proTGFβ1». Помимо блокирования высвобождения активного фактора роста TGFβ1 из связанных с клеткой комплексов, ассоциированный с клеткой proTGFβ1 может являться мишенью для интернализации (например, эндоцитоза) и/или уничтожения клеток, например, ADCC, ADCP или ADC-опосредованное истощение целевых клеток, экспрессирующих такие комплексы клеточной поверхности.

[111] *Ингибитор контрольной точки:* В контексте настоящего раскрытия ингибиторы контрольной точки относятся к ингибиторам иммунной контрольной точки и имеют значение, понятное в настоящей области техники. Как правило, мишенью является молекула рецептора на Т-клетках или NK-клетках, или соответствующий лиганд клеточной поверхности на антигенпрезентирующих клетках (APC) или опухолевых клетках. Иммунные контрольные точки активируются в иммунных клетках, чтобы предотвратить развитие воспалительного иммунитета против «себя». Следовательно, изменение баланса иммунной системы посредством ингибирования контрольных точек должно позволить ей полностью активироваться для обнаружения и устранения рака. Наиболее известными ингибирующими рецепторами, участвующими в контроле иммунного ответа, являются цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген-4 (CTLA-4), белок 1 запрограммированной

смерти клеток (PD-1), PD-L1, домен Т-клеточного иммуноглобулина и домен 3 муцина. (TIM3), ген 3 активации лимфоцитов (LAG3), иммуноглобулиноподобный рецептор клеток-киллеров (KIR), глюкокортикоид-индуцированный рецептор фактора некроза опухоли (GITR) и содержащий иммуноглобулин-V-домен (Ig) супрессор активации Т-клеток (VISTA). Неограничивающие примеры ингибиторов контрольных точек включают в себя: ниволумаб, пембролизумаб, BMS-936559, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, ипилимумаб, тремелимумаб, IMP-321, BMS-986016 и лирилумаб. Кейтруда® является одним из примеров ингибиторов PD-1. Терапия, в которой используется один или несколько ингибиторов иммунных контрольных точек, может называться терапией блокадой контрольных точек (CBT).

[112] *Клиническая эффективность:* Используемый в настоящем документе термин «клиническая эффективность» включает в себя как эффективность, так и безопасность терапии. Таким образом, терапевтическое лечение, которое обеспечивает желаемую клиническую эффективность, является одновременно эффективным (например, обеспечивает терапевтически благоприятные эффекты) и безопасным (например, с переносимыми или приемлемыми уровнями токсичности или побочных эффектов).

[113] *Комбинированная терапия:* «Комбинированная терапия» относится к схемам лечения по клиническим показаниям, которые содержат два или более терапевтических средства. Таким образом, термин относится к схеме лечения, в которой первая терапия, содержащая первую композицию (например, активный ингредиент), вводится в сочетании со второй терапией, содержащей вторую композицию (активный ингредиент), пациенту, предназначенной для лечения того же самого или сочетанного заболевания или клинического состояния. И первая, и вторая композиции могут действовать на одну и ту же клеточную мишень или отдельные клеточные мишени. Фраза «в сочетании с» в контексте комбинированной терапии означает, что терапевтические эффекты первой терапии временно и/или пространственно перекрываются с терапевтическими эффектами второй терапии у субъекта, получающего комбинированную терапию. Таким образом, комбинированные терапии могут быть составлены в виде единого состава для одновременного введения или в виде отдельных составов для последовательного введения терапий. Когда субъекту, которого лечили первой терапией для лечения заболевания, вводят вторую терапию для лечения того же заболевания, вторую терапию можно называть дополнительной терапией или вспомогательной терапией.

[114] *Комбинированный или комбинаторный эпитоп:* Комбинаторный эпитоп представляет собой эпитоп, который распознается и связывается комбинаторным антителом на участке (т.е. антигенной детерминанте), образованном несмежными частями

компонента или компонентов антигена, которые в трехмерной структуре собираются в непосредственной близости, чтобы сформировать эпитоп. Таким образом, антитела согласно настоящему изобретению могут связывать эпитоп, образованный двумя или более компонентами (например, частями или сегментами) про/латентного комплекса TGFβ1. Комбинаторный эпитоп может содержать аминокислотный(ые) остаток(остатки) из первого компонента комплекса и аминокислотный(ые) остаток(остатки) из второго компонента комплекса и так далее. Каждый компонент может состоять из одного белка или из двух или более белков антигенного комплекса. Комбинаторный эпитоп формируется за счет структурных вкладов двух или более компонентов (например, частей или сегментов, таких как аминокислотные остатки) антигена или антигенного комплекса.

[115] *Конкурировать или перекрестно конкурировать; перекрестно блокировать:* термин «конкурировать» при использовании в контексте антигенсвязывающих белков (например, антитела или его антигенсвязывающей части), которые конкурируют за один и тот же эпитоп, означает конкуренцию между антигенсвязывающими белками, как определено анализом, в котором тестируемый антигенсвязывающий белок предотвращает или ингибирует (например, снижает) специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка с общим антигеном (например, TGFβ1 или его фрагментом). Для определения того, конкурирует ли один антигенсвязывающий белок с другим, можно использовать многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), сэндвич-анализ конкуренции; твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA; твердофазный анализ с прямым мечением и твердофазный прямой сэндвич-анализ с прямым мечением. Как правило, когда конкурирующий антигенсвязывающий белок присутствует в избытке, он будет ингибировать (например, снижать) специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка с общим антигеном по меньшей мере на 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или 75% или более. В некоторых случаях связывание ингибируется по меньшей мере на 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97% или 97% или более.

[116] Согласно некоторым вариантам осуществления первое антитело или его антигенсвязывающая часть и второе антитело или его антигенсвязывающая часть «перекрестно блокируют» друг друга по отношению к одному и тому же антигену, например, по данным анализов Biacor или Octet®, с использованием стандартных условий тестирования, например, согласно инструкциям производителя (например, связывание при комнатной температуре, ~ 20-25°C). Согласно некоторым вариантам осуществления первое антитело или его фрагмент и второе антитело или его фрагмент могут иметь один и тот же

эпитоп. Согласно другим вариантам осуществления первое антитело или его фрагмент и второе антитело или его фрагмент могут иметь неидентичные, но перекрывающиеся эпитопы. Согласно другим вариантам осуществления первое антитело или его фрагмент и второе антитело или его фрагмент могут иметь отдельные (разные) эпитопы, которые находятся в непосредственной близости в трехмерном пространстве, так что связывание антитела перекрестно блокируется посредством стерических препятствий. «Перекрестное блокирование» означает, что связывание первого антитела с антигеном предотвращает связывание второго антитела с тем же антигеном, и аналогично связывание второго антитела с антигеном предотвращает связывание первого антитела с тем же антигеном.

[117] Сортировка антител (иногда называемое эпитоп-специфической сортировкой или картированием эпитопов) может быть выполнена для характеристики и сортировки набора (например, «библиотеки») моноклональных антител, созданных против целевого белка или белкового комплекса (т.е. антигена). Такие антитела против одной и той же мишени испытывают против всех других антител в библиотеке попарно, чтобы оценить, блокируют ли антитела связывание друг друга с антигеном. Тесно связанные профили сортировки указывают на то, что антитела имеют одинаковый или близкородственный (например, перекрывающийся) эпитоп и «сортируются» вместе. Сортировка обеспечивает применимые профили структура-функция антител, которые имеют аналогичные связывающие области в одном и том же антигене, поскольку биологическая активность (например, интервенция; эффективность), вызванная связыванием антитела с его мишенью, вероятно, будет перенесена на другое антитело в той же группе сортировки. Таким образом, среди антител в одной и той же эпитопной группе антитела с более высокой аффинностью (более низкая KD), как правило, обладают большей эффективностью.

[118] *Определяющая комплементарность область:* Используемый в настоящем документе термин «CDR» относится к определяющей комплементарность области в вариабельных последовательностях антитела. Есть три CDR в каждой из вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи, которые обозначены как CDR1, CDR2 и CDR3, для каждой из вариабельных областей. Используемый в настоящем документе термин «набор CDR» относится к группе из трех CDR, которые встречаются в одной вариабельной области, которая может связываться с антигеном. Точные границы этих CDR были определены по-разному в зависимости от разных систем. Система, описанная Kabat (Kabat et al. (1987; 1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD)), не только обеспечивает однозначную систему нумерации остатков, применимую к любой вариабельной области антитела, но и также обеспечивает точные границы остатков, определяющие три CDR. Эти CDR могут называться CDR по Kabat.

Chothia с соавт. (Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; и Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883) обнаружили, что определенные субфрагменты в пределах CDR по Kabat принимают почти идентичные конформации пептидного остова, несмотря на большое разнообразие на уровне аминокислотной последовательности. Эти субфрагменты были обозначены как L1, L2 и L3 или H1, H2 и H3, или, L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3 или H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, где «L» и «H» обозначают области легкой цепи и тяжелой цепи соответственно. Эти области могут называться CDR по Chothia, границы которых перекрываются с CDR по Kabat. Другие границы, определяющие CDR, перекрывающиеся с CDR по Kabat, были описаны Padlan (1995) FASEB J. 9: 133-139 и MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5): 732-45. Тем не менее, другие определения границ CDR могут не строго соответствовать одной из описанных в настоящем документе систем, но, тем не менее, будут перекрываться с CDR по Kabat, хотя они могут быть сокращены или удлинены в свете прогнозов или экспериментальных результатов о том, что отдельные остатки или группы остатков или даже целые CDR существенно не влияют на связывание антигена (см., например: Lu X et al., MAbs. 2019 Jan;11(1): 45-57). В используемых в настоящем документе способах могут использоваться CDR, определенные в соответствии с любой из этих систем, хотя согласно определенным вариантам осуществления используются CDR, определенные по Kabat или Chothia.

[119] *Конформационный эпитоп:* Конформационный эпитоп представляет собой эпитоп, который распознается и связывается конформационным антителом в трехмерной конформации, но не в несвернутом пептиде с той же аминокислотной последовательностью. Конформационный эпитоп может называться конформационно-специфическим эпитопом, конформационно-зависимым эпитопом или конформационно-чувствительным эпитопом. Соответствующее антитело или его фрагмент, которые специфически связываются с таким эпитопом, можно называть конформационно-специфическим антителом, конформационно-селективным антителом или конформационно-зависимым антителом. Связывание антигена с конформационным эпитопом зависит от трехмерной структуры (конформации) антигена или антигенного комплекса.

[120] *Константная область:* Константный домен иммуноглобулина относится к константному домену тяжелой или легкой цепи. Аминокислотные последовательности константного домена тяжелой цепи и легкой цепи IgG человека известны в настоящей области техники.

[121] *Контекстно-смещенные:* Используемый в настоящем документе термин «контекстно-смещенные антитела» относятся к типу конформационных антител, которые

связывают антиген с разными аффинностями, когда антиген ассоциирован с (т.е. связан или прикреплен к) взаимодействующим белком или его фрагментом. Таким образом, контекстно-смещенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом в proTGFβ1, может связывать LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1 с разными аффинностями. Например, антитело называют «смещенным в отношении матрикса», если оно имеет более высокую аффинность к ассоциированным с матриксом комплексам proTGFβ1 (например, LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ1), чем к ассоциированным с клеткой комплексам proTGFβ1 (например, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1). Относительные аффинности [ассоциированных с матриксом комплексов]: [ассоциированных с клеткой комплексов] можно получить, взяв средние значения K_D для первых, взяв средние значения K_D для последних и вычислив соотношение двух, как проиллюстрировано в настоящем документе.

[122] *Контекстно-независимый:* Согласно настоящему раскрытию, «контекстно-независимое антитело», которое связывает proTGFβ1, характеризуется эквивалентными аффинностями к четырем известным комплексам презентирующая молекула-proTGFβ1, а именно LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1. Контекстно-независимые антитела, раскрытые в настоящей заявке, также можно охарактеризовать как несмещенные. Как правило, контекстно-независимые антитела демонстрируют эквивалентные аффинности (т.е. не более чем пятикратное отклонение), так что относительные отношения измеренных значений KD между ассоциированными с матриксом комплексами и ассоциированными с клеткой комплексами не превышают 5, как измерено с помощью подходящего анализа связывания in vitro, такой как поверхностный плазмонный резонанс, биослойная интерферометрия (BLI) и/или титрование равновесного раствора (например, MSD-SET).

[123] *Ассоциированный с ECM- TGFβ1/proTGFβ1:* Термин относится к TGFβ1 или его сигнальному комплексу (например, про/латентный TGFβ1), который является компонентом внеклеточного матрикса (например, депонирован в нем). TGFβ1, который презентируется LTBP1 или LTBP3, представляет собой ECM-ассоциированный TGFβ1, а именно LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ1 соответственно. LTBP имеют критически важное значение для правильного депонирования и последующей биодоступности TGFβ в ECM, где фибриллин (Fbn) и фибронектин (FN), как полагают, являются основными матричными белками, ответственными за ассоциацию LTBP с ECM. Такими латентными комплексами, ассоциированными с матриксом, обогащены соединительные ткани, а также некоторые ткани, ассоциированные с заболеванием, такие как строма опухоли и фиброзные ткани. Человеческий аналог презентирующей молекулы или комплекса презентирующей

молекулы может обозначаться буквой «h» перед белком или белковым комплексом, например, «*h*LTBP1», «*h*LTBP1-proTGFβ1», «*h*LTBP3» и «*h*LTBP3-proTGFβ1».

[124] *Эффективное количество:* «Эффективное количество» (или терапевтически эффективное количество, или терапевтическая доза) представляет собой дозировку или схему введения доз, которая обеспечивает статистически значимые клинические результаты (например, эффективность) в популяции пациентов. Например, было показано, что Ab6 эффективен при дозах от 3 мг/кг до 30 мг/кг в доклинических моделях. Таким образом, можно сказать, что эффективное количество Ab6 составляет приблизительно 3-30 мг/кг.

[125] *Эффективный контроль опухоли:* Термин «эффективный контроль опухоли» можно использовать для обозначения степени регрессии опухоли, достигаемой в ответ на лечение, когда, например, опухоль регрессирует на определенную долю (например, <25%) предварительно установленного конечного объема опухоли. Например, в конкретной модели, если предварительно установленный конечный объем опухоли установлен на уровне 2000 мм^3, эффективный контроль опухоли достигается, если опухоль уменьшается до менее чем 500 мм^3, предполагая порог <25%. Следовательно, эффективный контроль опухоли подразумевает полную регрессию. Клинически эффективный контроль опухоли включает в себя частичный ответ (PR) и полный ответ (CR) на основе признанных в настоящей области техники критериев, таких как RECIST 1,1 и соответствующий iRECIST. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективный контроль опухоли в клинических условиях также включает в себя стабильное заболевание, при котором рост опухолей, которые, как обычно ожидается, будут расти с определенной скоростью, предотвращается с помощью лечения, даже если уменьшение размера не достигается.

[126] *Эффекторные Т-клетки:* Используемый в настоящем документе термин «эффекторные Т-клетки» представляют собой Т-лимфоциты, которые активно отвечают сразу на стимул, такой как костимуляция, и включают в себя без ограничения CD4+ Т-клетки (также называемые Т-хелперами, или Th-клетками) и CD8+ Т-клетки (также называемые цитотоксическими Т-клетками). Th-клетки помогают другим лейкоцитам в иммунологических процессах, включая в себя созревание В-клеток в плазматические клетки и В-клетки памяти, а также активацию цитотоксических Т-клеток и макрофагов. Эти клетки также известны как CD4+ Т-клетки, потому что они экспрессируют гликопротеин CD4 на своей поверхности. Хелперные Т-клетки активируются, когда они презентированы пептидными антигенами молекулами MHC класса II, которые экспрессируются на поверхности антигенпрезентирующих клеток (APC). После активации они быстро делятся и выделяют небольшие белки, называемые цитокинами, которые регулируют активный

иммунный ответ или содействуют ему. Эти клетки могут дифференцироваться в один из нескольких подтипов, включая в себя Th1, Th2, Th3, Th17, Th9 или TFh, которые секретируют разные цитокины для облегчения различных типов иммунных ответов. Передача сигналов от APC направляет Т-клетки на определенные подтипы. Цитотоксические (клетки-киллеры). Цитотоксические Т-клетки (ТС-клетки, CTL, Т-киллерные клетки, киллерные Т-клетки), с другой стороны, разрушают инфицированные вирусом клетки и раковые клетки, а также участвуют в отторжении трансплантата. Эти клетки также известны как CD8+ Т-клетки, поскольку они экспрессируют гликопротеин CD8 на своей поверхности. Эти клетки распознают свои мишени путем связывания с антигеном, ассоциированным с молекулами MHC класса I, которые присутствуют на поверхности всех ядерных клеток. Цитотоксические эффекторные клетки (например, клетки CD8+) включают в себя, например, перфорин и гранзим B.

[127] *Эпитоп:* Термин «эпитоп» может также называться антигенной детерминантой, представляет собой молекулярную детерминанту (например, полипептидную детерминанту), которая может специфически связываться связывающим средством, иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. Детерминанты эпитопа включают в себя химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорил или сульфонил, и, согласно определенным вариантам осуществления, могут иметь определенные трехмерные структурные характеристики и/или специфические характеристики заряда. Эпитоп, распознаваемый антителом или антигенсвязывающим фрагментом антитела, является структурным элементом антигена, который взаимодействует с CDR (например, комплементарным сайтом) антитела или фрагмента. Эпитоп может быть образован за счет вкладов нескольких аминокислотных остатков, которые взаимодействуют с CDR антитела для получения специфичности. Антигенный фрагмент может содержать более одного эпитопа. Согласно определенным вариантам осуществления антитело специфически связывается с антигеном, когда оно распознает свой антиген-мишень в сложной смеси белков и/или макромолекул. Например, говорят, что антитела «связываются с одним и тем же эпитопом», если антитела перекрестно конкурируют друг с другом (одно предотвращает связывание или модулирующий эффект другого).

[128] *Эквивалентная аффинность:* в контексте настоящего раскрытия термин «эквивалентная аффинность/аффинности» предназначен для обозначения следующего: i) антитело связывает ассоциированные с матриксом комплексы proTGFb1 и ассоциированные с клеткой комплексы proTGFb1 с менее чем пятикратным смещением по аффинности, как измерено с помощью подходящих анализов связывания in vitro, таких как

титрование равновесного раствора (например, MSD-SET), биослойная интерферометрия (например, Octet®) или поверхностный плазмонный резонанс (например, Biacore System; и/или ii) относительные аффинности антитела к четырем комплексам одинаковы в том, что либо самая низкая аффинность (максимальное числовое значение KD), которое демонстрирует антитело среди четырех антигенных комплексов, не более чем в пять раз меньше среднего значения, рассчитанного из оставшихся трех аффинностей; или самая высокая аффинность (наименьшее числовое значение KD), которое демонстрирует антитело среди четырех антигенных комплексов, не более чем в пять раз превышает среднее значение, рассчитанное по остальным трем аффинностям. Антитела с эквивалентными аффинностями могут достигать более однородных ингибирующих эффектов, независимо от конкретной презентирующей молекулы, связанной с комплексом proTGFβ1 (следовательно, являются «контекстно-независимыми»). Согласно особенно предпочтительным вариантам осуществления смещение, наблюдаемое между ассоциированными с матриксом комплексами и ассоциированными с клеткой комплексами, не превышает трехкратного.

[129] *Увеличенное лассо латентности:* Используемый в настоящем документе термин «увеличенное лассо латентности» относится к части продомена, которая содержит лассо латентности и спираль альфа-2, например, LASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTR (SEQ ID NO: 154). Согласно некоторым вариантам осуществления увеличенное лассо латентности дополнительно содержит часть спирали альфа-1, например, LVKRKRIEA (SEQ ID NO: 159) или ее часть.

[130] *Фиброз:* термин «фиброз» или «фиброзное состояние/нарушение» относится к процессу или проявлению, характеризующемуся патологическим накоплением компонентов внеклеточного матрикса (ECM), таких как коллагены, в ткани или органе.

[131] *Фиброзное микроокружение:* термин «фиброзное микроокружение» относится к нише местного заболевания в ткани, в которой фиброз возникает in vivo. Фиброзное микроокружение может содержать ассоциированную с заболеванием молекулярную сигнатуру (набор хемокинов, цитокинов и т.д.), популяции ассоциированных с заболеванием клеток (например, активированные макрофаги, MDSC и т.д.), а также ассоциированные с заболеванием среды ECM (изменения в компонентах и/или структуре ECM). Считается, что фибротическое микроокружение поддерживает переход фибробласта в α-гладкомышечный актин-положительный миофибробласт TGFβ-зависимым образом. Фиброзное микроокружение может дополнительно характеризоваться инфильтрацией определенных иммунных клеток (таких как макрофаги и MDSC).

[132] *Finger-1 (фактора роста TGFβ1):* Используемый в настоящем документе термин «Finger-1» представляет собой домен в домене фактора роста TGFβ1. В своей немутированной форме Finger-1 proTGFβ1 человека содержит следующую аминокислотную последовательность: CVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFC (SEQ ID NO: 151). В трехмерной структуре домен Finger-1 (часть показана как область «5a» на фиг. 18 и 19) находится в непосредственной близости от лассо латентности.

[133] *Finger-2 (фактора роста TGFβ1):* Используемый в настоящем документе термин «Finger-2» представляет собой домен в домене фактора роста TGFβ1. В своей немутированной форме Finger-2 proTGFβ1 человека содержит следующую аминокислотную последовательность: CVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS (SEQ ID NO: 152). Finger-2 включает в себя «связывающую область 6» (т.е. «6a» и «6b»), изображенную на фиг. 18 и 19, которые пространственно лежат в непосредственной близости от лассо латентности.

[134] *Комплекс GARP-proTGFβ1:* Используемый в настоящем документе термин «комплекс GARP-TGFβ1» относится к белковому комплексу, содержащему пропротеиновую форму или латентную форму белка трансформирующего фактора роста-β1 (TGFβ1) и белка преобладающих повторов гликопротеина-A (GARP) или его фрагмента или варианта. Согласно некоторым вариантам осуществления пропротеиновая форма или латентная форма белка TGFβ1 может называться «про/латентный белок TGFβ1». Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс GARP-TGFβ1 содержит GARP, ковалентно связанный с про/латентным TGFβ1 через одну или несколько дисульфидных связей. В природе такие ковалентные связи образуются остатками цистеина, присутствующими рядом с N-концом (например, в положении 4 аминокислоты) димерного комплекса proTGFβ1. Согласно другим вариантам осуществления комплекс GARP-TGFβ1 содержит GARP, нековалентно связанный с про/латентным TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс GARP-TGFβ1 представляет собой встречающийся в природе комплекс, например комплекс GARP-TGFβ1 в клетке. Термин «hGARP» обозначает GARP человека.

[135] *Высокоаффинный:* Используемый в настоящем документе термин «высокоаффинный» в выражении «высокоаффинное антитело proTGFβ1» относится к активностям связывания in vitro, имеющим значение $K_D \leq 5$ нМ, более предпочтительно $\leq$ 1 нМ. Таким образом, высокоаффинное, контекстно-независимое антитело proTGFβ1, охватываемое настоящим изобретением, имеет значение $K_D \leq 5$ нМ, более предпочтительно $\leq$ 1 нМ, по отношению к каждому из следующих антигенных комплексов: LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1.

[136] *Антитело человека:* Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин «антитело человека» включает в себя антитела, имеющие вариабельные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека согласно настоящему изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом in vitro или соматической мутацией in vivo), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Тем не менее, подразумевается, что используемый в настоящем документе термин «антитело человека» не включает в себя антитела, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты к каркасным последовательностям человека.

[137] *Гуманизированное антитело:* Термин «гуманизированное антитело» относится к антителам, которые содержат последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей из не относящихся к человеку видов (например, мыши), но в которых по меньшей мере часть последовательности VH и/или VL была изменена, чтобы стать более «похожей на человека», т.е. более похожей на вариабельные последовательности зародышевой линии человека. Одним из типов гуманизированных антител является антитело с привитыми CDR, в котором последовательности CDR человека введены в последовательности VH и VL, не относящиеся к человеку, для замены соответствующих последовательностей CDR, не относящихся к человеку. Кроме того, «гуманизированное антитело» представляет собой антитело или его вариант, производное, аналог или фрагмент, которое иммуноспецифически связывается с представляющим интерес антигеном и которое содержит область FR, имеющую по существу аминокислотную последовательность человеческого антитела, и область CDR, имеющую по существу аминокислотную последовательность антитела, не относящегося к человеку. Используемый в настоящем документе термин «по существу» в контексте CDR относится к CDR, имеющей аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности CDR антитела, не относящегося к человеку. Гуманизированное антитело содержит по существу все из по меньшей мере одного, а, как правило, двух вариабельных доменов (Fab, Fab', F(ab')2, FabC, Fv), в которых все или по существу все области CDR соответствуют таковым в иммуноглобулине, не относящемся к человеку (т.е. донорское антитело) и все или по существу все области FR являются таковыми из консенсусной последовательности

иммуноглобулина человека. Согласно одному из вариантов осуществления гуманизированное антитело также содержит по меньшей мере часть Fc-области иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Согласно некоторым вариантам осуществления гуманизированное антитело содержит легкую цепь, а также по меньшей мере вариабельный домен тяжелой цепи. Антитело также может включать в себя области CH1, шарнира, CH2, CH3 и CH4 тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированную легкую цепь. Согласно некоторым вариантам осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированную тяжелую цепь. Согласно конкретным вариантам осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированный вариабельный домен легкой цепи и/или гуманизированную тяжелую цепь.

[138] *Масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS):* HDX-MS представляет собой хорошо известную технику, используемую для исследования конформации белков и белок-белковых взаимодействий в растворе путем измерения степени доступности растворителя. См., например, Wei et al., (2014) Drug Discov Today 19 (1): 95-102. «Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics: methodology and applications». Технику HDX-MS можно использовать для определения области или областей антигена, связанных с антителом (т.е. «область(и) связывания»). Таким образом, такая(ие) область(и) связывания может(могут) содержать или образовывать эпитоп.

[139] *Опухоль с иммунной эксклюзией (опухоль с иммунной эксклюзией или иммуно-исключенная опухоль):* В настоящем документе опухоли, характеризуемые как «с иммунным исключением», лишены или по существу лишены внутриопухолевых противоопухолевых лимфоцитов. Например, опухоли с плохо инфильтрированными Т-клетками могут содержать Т-клетки, которые окружают опухоль, например, по внешнему периметру опухолевой массы и/или вблизи сосудистых сетей опухоли («периваскулярных»), которые, тем не менее, не могут эффективно попадать в опухоль для осуществления цитотоксической функции против раковых клеток. В других ситуациях опухоли не могут спровоцировать сильный иммунный ответ (так называемые «холодные» опухоли или опухоли «иммунной пустыни»), так что мало Т-клеток присутствует вблизи и в окружении опухоли. В отличие от опухолей с иммунным исключением опухоли, инфильтрированные противоопухолевыми лимфоцитами, иногда характеризуются как «горячие» или «воспаленные» опухоли; такие опухоли, как правило, более чувствительны к терапии блокадой иммунных контрольных точек («CBT») и поэтому являются ее целью.

Однако, как правило, только часть пациентов отвечает на CBT из-за иммунного исключения, которая делает опухоль устойчивой к CBT.

[140] *Иммуносупрессия, иммуносупрессивный:* Эти термины относятся к способности подавлять иммунные клетки, такие как Т-клетки, NK-клетки и В-клетки. Золотым стандартом для оценки иммуносупрессивной функции является ингибирование активности Т-клеток, которое может включать в себя антиген-специфическую супрессию и неспецифическую супрессию. Регуляторные Т-клетки (Treg) и MDSC можно рассматривать как иммуносупрессивные клетки. М2-поляризованные макрофаги (например, локализованные очагом заболевания макрофаги, такие как TAM и FAM) также можно охарактеризовать как иммуносупрессивные.

[141] *Иммунологическая память:* Иммунологическая память относится к способности иммунной системы быстро и специфично распознавать антиген, с которым организм ранее столкнулся, и инициировать соответствующий иммунный ответ. Как правило, это вторичные, третичные и другие последующие иммунные ответы на один и тот же антиген. Иммунологическая память отвечает за адаптивный компонент иммунной системы, особые Т- и В-клетки - так называемые Т- и В-клетки памяти. Антиген-наивные Т-клетки увеличиваются количественно и дифференцируются в Т-клетки памяти и эффекторные Т-клетки после того, как они сталкиваются со своим родственным антигеном в контексте молекулы MHC на поверхности профессиональной антигенпрезентирующей клетки (например, дендритной клетки). Единственная объединяющая тема для всех подтипов Т-клеток памяти заключается в том, что они являются долгоживущими и могут быстро увеличиваться до большого количества эффекторных Т-клеток при повторном воздействии на них распознанного антигена. Посредством этого механизма они обеспечивают иммунную систему «памятью» против ранее встреченных патогенов. Т-клетки памяти могут быть CD4+ или CD8+ и, как правило, экспрессируют CD45RO. В доклинических условиях иммунологическая память может быть проверена в парадигме повторной антигенной стимуляции опухоли.

[142] *Специфический в отношении изоформы:* термин «специфичность в отношении изоформы» относится к способности средства отличать одну изоформу от других структурно родственных изоформ (т.е. селективность). Специфичный в отношении изоформы ингибитор TGFβ проявляет свою ингибирующую активность в отношении одной изоформы TGFβ, но не других изоформ TGFβ в данной концентрации. Например, антитело к TGFβ1, специфическое в отношении изоформы, селективно связывает TGFβ1. TGFβ1-специфический ингибитор (антитело) предпочтительно нацелен (связывается, тем самым, ингибирует) изоформу TGFβ1, а не TGFβ2 или TGFβ3 с существенно большей

аффинностью. Например, селективность в этом контексте может относиться к по меньшей мере 500-1000-кратной разнице соответствующих аффинностей, измеренных с помощью анализа связывания in vitro, такого как Octet® и Biacor. Согласно некоторым вариантам осуществления селективность такова, что ингибитор при использовании в дозировке, эффективной для ингибирования TGFβ1 in vivo, не ингибирует TGFβ2 и TGFβ3. Чтобы такой ингибитор был применим в качестве терапевтического средства, доза для достижения желаемых эффектов (например, терапевтически эффективные количества) должна находиться в пределах окна, в пределах которого ингибитор может эффективно ингибировать изоформу TGFβ1 без ингибирования TGFβ2 или TGFβ3.

[143] *Выделенный:* Используемый в настоящем документе термин «выделенное» антитело относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное антитело по существу не содержит другого непредусмотренного клеточного материала и/или химических веществ.

[144] *Большой латентный комплекс:* термин «большой латентный комплекс» («LLC») в контексте настоящего раскрытия относится к комплексу, состоящему из димера proTGFβ1, связанного с так называемой презентирующей молекулой. Таким образом, большой латентный комплекс представляет собой комплекс презентирующая молекула-proTGFβ1, такой как LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1. Такие комплексы могут быть образованы in vitro с использованием рекомбинантных очищенных компонентов, способных образовывать комплекс. Для целей скрининга презентирующие молекулы, используемые для образования таких LLC, не обязательно должны являться полноразмерными полипептидами; однако, как правило, требуется часть белка, способная образовывать дисульфидные связи с димерным комплексом proTGFβ1 через остатки цистеина вблизи его N-концевых областей.

[145] *Пептид, ассоциированный с латентностью (LAP):* LAP является так называемым «продоменом» proTGFβ1. Как описано более подробно в настоящем документе, LAP состоит из домена «Straight Jacket» и домена «Arm». Сам Straight Jacket далее делится на домены спираль альфа-1 Alpha-1 Helix) и лассо латентности (Latency Lasso).

[146] *Лассо латентности:* Используемый в настоящем документе термин «лассо латентности», иногда также называемый петлей латентности, представляет собой домен, фланкированный спиралью альфа-1 (Alpha-1 Helix) и плечом (Arm) в продомене proTGFb1. В своей немутированной форме лассо латентности proTGFβ1 человека содержит аминокислотную последовательность: LASPPSQGEVPPGPL (SEQ ID NO: 153) и по

существу соответствует областям «2a» и «2b», показанным на фиг. 18A и охватывает область 1, обозначенную на фиг. 19A. Используемый в настоящем документе термин «увеличенная область лассо латентности» относится к лассо латентности вместе с его непосредственным C-концевым мотивом, называемым спиралью альфа-2 (α2-спираль) продомена. Остаток пролина, который находится на C-конце лассо латентности, обеспечивает перпендикулярный «поворот», подобный «локтю», который соединяет петлю лассо с α2-спиралью. Увеличенное лассо латентности содержит области, показанные как «2a», «2b» и «2c» на фиг. 18 и 19. Определенные ингибиторы активации TGFβ1 с высокой аффинностью связываются, по меньшей мере частично, с лассо латентности или его частью, чтобы придать ингибирующую активность (например, способность блокировать активацию), при этом необязательно часть лассо латентности представляет собой ASPPSQGEVPPGPL (SEQ ID NO: 266). Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению связывают комплекс proTGFβ1 на ASPPSQGEVPPGPL (SEQ ID NO: 266) или его части. Определенные ингибиторы активации TGFβ1 с высокой аффинностью связываются, по меньшей мере частично, с увеличенным лассо латентности или его частью, чтобы придать ингибирующую эффективность (например, способность блокировать активацию), при этом необязательно часть увеличенного лассо латентности представляет собой KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL (SEQ ID NO: 169).

[147] *Локализованный:* в контексте настоящего раскрытия термин «локализованный» (например, «локализованная опухоль», «локализованный очагом заболевания» и т.д.) относится к анатомически изолированным или изолируемым аномалиям, таким как солидные злокачественные новообразования, в отличие от системного заболевания. Определенный лейкоз, например, может иметь как локализованный компонент (например, костный мозг), так и системный компонент (например, циркулирующие клетки крови) заболевания.

[148] *Комплекс LRRC33-proTGFβ1:* Используемый в настоящем документе термин «комплекс LRRC33-TGFβ1» относится к комплексу между про-протеиновой формой или латентной формой белка трансформирующего фактора роста-β1 (TGFβ1) и белком 33, содержащим богатый лейцином повтор (LRRC33; также известный как отрицательный регулятор активных форм кислорода или NRROS) или его фрагментом или вариантом. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LRRC33-TGFβ1 содержит LRRC33, ковалентно связанный с про/латентным TGFβ1 посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В природе такие ковалентные связи образуются остатками цистеина, присутствующими рядом с N-концом (например, в положении 4

аминокислоты) димерного комплекса proTGFβ1. Согласно другим вариантам осуществления комплекс LRRC33-TGFβ1 содержит LRRC33, нековалентно связанный с про/латентным TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LRRC33-TGFβ1 представляет собой встречающийся в природе комплекс, например комплекс LRRC33-TGFβ1 в клетке. Термин «hLRRC33» обозначает LRRC33 человека. In vivo комплексы, содержащие LRRC33 и LRRC33, на поверхности клетки могут интернализоваться. LRRC33 экспрессируется на подгруппе миелоидных клеток, включая в себя M2-поляризованные макрофаги (такие как TAM) и MDSC.

[149] *Комплекс LTBP1-proTGFβ1:* Используемый в настоящем документе термин «комплекс LTBP1-TGFβ1» относится к белковому комплексу, содержащему пропротеиновую форму или латентную форму белка трансформирующего фактора роста-β1 (TGFβ1) и латентный связывающий TGF-бета белок 1 (LTBP1) или его фрагмент или вариант. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LTBP1-TGFβ1 содержит LTBP1, ковалентно связанный с про/латентным TGFβ1 посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В природе такие ковалентные связи образуются остатками цистеина, присутствующими рядом с N-концом (например, в положении 4 аминокислоты) димерного комплекса proTGFβ1. Согласно другим вариантам осуществления комплекс LTBP1-TGFβ1 содержит LTBP1, нековалентно связанный с про/латентным TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LTBP1-TGFβ1 представляет собой встречающийся в природе комплекс, например комплекс LTBP1-TGFβ1 в клетке. Термин «hLTBP1» обозначает LTBP1 человека.

[150] *Комплекс LTBP3-proTGFβ1:* Используемый в настоящем документе термин «комплекс LTBP3-TGFβ1» относится к белковому комплексу, содержащему пропротеиновую форму или латентную форму белка трансформирующего фактора роста-β1 (TGFβ1) и латентный связывающий TGF-бета белок 3 (LTBP3) или его фрагмент или вариант. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LTBP3-TGFβ1 содержит LTBP3, ковалентно связанный с про/латентным TGFβ1 посредством одной или нескольких дисульфидных связей. В природе такие ковалентные связи образуются остатками цистеина, присутствующими рядом с N-концом (например, в положении 4 аминокислоты) димерного комплекса proTGFβ1. Согласно другим вариантам осуществления комплекс LTBP3-TGFβ1 содержит LTBP1, нековалентно связанный с про/латентным TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LTBP3-TGFβ1 представляет собой встречающийся в природе комплекс, например комплекс LTBP3-TGFβ1 в клетке. Термин «hLTBP3» обозначает LTBP3 человека.

[151] *M2 или M2-подобные макрофаги:* Макрофаги M2 представляют собой подкласс активированных или поляризованных макрофагов и включают в себя ассоциированные с заболеванием макрофаги как в фиброзном, так и в опухолевом микроокружении. Маркеры клеточной поверхности для M2-поляризованных макрофагов, как правило, включают в себя CD206 и CD163 (т.е. CD206+/CD163+). M2-поляризованные макрофаги также могут экспрессировать LRRC33 клеточной поверхности. Активации макрофагов M2 в основном способствуют IL-4, IL-13, IL-10 и TGFβ; они секретируют те же цитокины, которые их активируют (IL-4, IL-13, IL-10 и TGFβ). Эти клетки обладают высокой фагоцитарной способностью и продуцируют компоненты ECM, ангиогенные и хемотаксические факторы. Высвобождение TGFβ макрофагами может увековечивать активацию миофибробластов, индукцию EMT и EndMT в пораженных тканях, таких как фиброзная ткань и строма опухоли. Например, макрофаги M2 необходимы для фиброза легких, вызванного TGFβ, кроме того, ими обогащен ряд опухолей.

[152] *Ассоциированный с матриксом proTGFβ1:* LTBP1 и LTBP3 являются презентирующими молекулами, которые являются компонентами внеклеточного матрикса (ECM). LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ1 могут вместе называться «ассоциированными с ECM» (или «ассоциированными с матриксом») комплексами proTGFβ1, которые опосредуют активацию/передачу сигналов TGFβ1, ассоциированного с ECM. Термин также включает в себя рекомбинантные очищенные комплексы LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ1 в растворе (например, анализы in vitro), которые физически не прикреплены к матриксу или субстрату.

[153] *Максимально переносимая доза (MTD):* Термин MTD, в общем, относится, в контексте соображений безопасности/токсикологии, к наибольшему количеству исследуемого препарата (такого как ингибитор TGFβ1), оцененному с уровнем отсутствия наблюдаемых побочных эффектов. (NOAEL). Например, NOAEL для Ab6 у крыс был самой высокой оцененной дозой (100 мг/кг), что позволяет предположить, что MTD для Ab6 составляет > 100 мг/кг, на основании четырехнедельного токсикологического исследования. NOAEL для Ab6 у не относящихся к человеку приматов было самой высокой оцененной дозой (300 мг/кг), что позволяет предположить, что MTD для Ab6 у относящихся к человеку приматов составляет > 300 мг/кг, на основании четырехнедельного токсикологического исследования.

[154] *Meso-Scale Discovery:* «Meso-Scale Discovery» или «MSD» представляет собой тип иммуноанализа, в котором в качестве метода обнаружения используется электрохемилюминесценция (ECL). Как правило, для захвата белков (например, антител) используются углеродные электроды с высоким связыванием. Антитела можно

инкубировать с определенными антигенами, связывание которых можно обнаружить с помощью вторичных антител, конъюгированных с электрохемилюминесцентными метками. С помощью электрического сигнала можно измерить интенсивность света для количественного определения аналитов в образце.

[155] *Миелофиброз:* «Миелофиброз», также известный как остеомиелофиброз, представляет собой относительно редкое пролиферативное нарушение костного мозга (например, рак), которое относится к группе заболеваний, называемых миелопролиферативными нарушениями. Миелофиброз относится к отрицательной по филадельфийской хромосоме (-) ветви миелопролиферативных новообразований. Миелофиброз характеризуется пролиферацией аномального клона гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге и других участках, что приводит к фиброзу или замещению костного мозга рубцовой тканью. Термин миелофиброз охватывает первичный миелофиброз (PMF), также называемый хроническим идиопатическим миелофиброзом (cIMF) (термины идиопатический и первичный означают, что в этих случаях заболевание имеет неизвестное или спонтанное происхождение), а также вторичные типы миелофиброза, такие как миелофиброз, который развивается вторично по отношению к истинной полицитемии (PV) или эссенциальной тромбоцитемии (ET). Миелофиброз представляет собой форму миелоидной метаплазии, которая относится к изменению типа клеток в кроветворной ткани костного мозга, и часто эти два термина используются как синонимы. Термины агногенная миелоидная метаплазия и миелофиброз с миелоидной метаплазией (MMM) также используются для обозначения первичного миелофиброза. Миелофиброз характеризуется мутациями, которые вызывают положительную регуляцию или избыточную активацию нижележащего пути JAK.

[156] *Миелоидные клетки:* В гемопоэзе миелоидные клетки представляют собой клетки крови, которые возникают из клеток-предшественников гранулоцитов, моноцитов, эритроцитов или тромбоцитов (общий миелоидный предшественник, т.е. CMP или CFU-GEMM), или также часто используется в более узком смысле, в частности, из линии миелобластов (миелоциты, моноциты и их дочерние типы), в отличие от лимфоидных клеток, т.е. лимфоцитов, которые происходят из общих лимфоидных клеток-предшественников, дающих начало В-клеткам и Т-клеткам . Ниже обобщенно приведены некоторые типы миелоидных клеток, их общая морфология, типичные маркеры клеточной поверхности и их иммуносупрессивная способность как у мышей, так и у человека.

Миелоидные клетки	Типичная морфология	Выберите фенотип поверхности	Иммуносупрессия
Мышь			
Нейтрофилы	Круглая форма с сегментированным ядром	CD11b+Ly6Ghi Ly6Clo	-
Моноциты	Круглая форма с зазубренным ядром	CD11b+ Ly6G− Ly6Chi	-
Макрофаги	Круглая форма с псевдоподиями	CD11b+ F4/80hi Ly6G− Ly6Clo CD80+ (M1)	-
		F4/80+ CD206+ CD163+ (M2)	-
Дендритные клетки	Дендритная форма с полиподиями	CD11b+ CD11c+ Ly6G− Ly6C−/lo (классический)	-
		CD11b− CD11c+ Ly6G− Ly6C− (классический)	-
		CD11b− CD11clo Ly6G− Ly6C+ PDCA-1+ (плазмацитоидный)	-
Фиброциты	Форма веретена	CD11b+ ColI+ Ly6G− Ly6C+	-
G-MDSC (PMN-MDSC)	Круглая форма с полосатым ядром	CD11b+ Ly6G+ Ly6Clo	+
M-MDSC	Круглая форма с зазубренным ядром	CD11b+ Ly6G− Ly6Chi	+
Человек			
Нейтрофилы	Круглая форма с сегментированным ядром	CD11b+ CD14− CD15+ CD66b+ LOX-1−	-
Моноциты	Круглая форма с зазубренным ядром	CD14+ CD15− CD16− HLA-DR+ (классический)	-
		CD14+ CD15− CD16+ HLA-DR+ (промежуточный)	-
		CD14− CD15− CD16+ HLA-DR+ (неклассический)	-
Макрофаги	Круглая форма с псевдоподиями	CD15− CD16+ CD80+ HLA-DR+ CD33+ (M1)	-
		CD11b+ CD15− CD206+ CD163+ HLA-DR+ (M2)	+/-
Дендритные клетки	Дендритная форма с полиподиями	CD14− CD16− CD1C+ CD83+ (классический)	-

		CD14− CD16− CD141+ CD83+ (классический)	-
		CD14− CD16− CD303+ CD83+ (плазмацитоидный)	-
Фиброциты	Форма веретена	CD11b+ ColI+ CD13+ CD34+ CD45RO+ HLA-DR+	-
G-MDSC (PMN-MDSC)	Круглая форма с кольцевым ядром	CD11b+ CD33+ CD14− CD15+ CD66b+ LOX-1+	+
M-MDSC	Круглая форма с зазубренным ядром	CD11b+ CD33+ CD14+ CD15− HLA-DR−/lo	+

[157] *Супрессорная клетка миелоидного происхождения:* Супрессоры клетки миелоидного происхождения (MDSC) представляют собой гетерогенную популяцию клеток, образующихся при различных патологических состояниях, и считается, что они представляют собой патологическое состояние активации моноцитов и относительно незрелых нейтрофилов. MDSC включают в себя по меньшей мере две категории клеток, называемых i) «гранулоцитарные» (G-MDSC) или полиморфноядерные (PMN-MDSC), которые фенотипически и морфологически сходны с нейтрофилами; и ii) моноцитарные (M-MDSC), фенотипически и морфологически сходные с моноцитами. MDSC характеризуются отличительным набором геномных и биохимических признаков и могут отличаться по специфическим молекулам поверхности. Например, человеческие G-MDSC/PMN-MDSC, как правило, экспрессируют маркеры клеточной поверхности CD11b, CD33, CD15 и CD66. Кроме того, человеческие G-MDSC/PMN-MDSC могут также экспрессировать HLA-DR и/или аргиназу. Для сравнения, человеческие M-MDSC, как правило, экспрессируют маркеры клеточной поверхности CD11b, CD33 и CD14. Кроме того, человеческие M-MDSC также могут экспрессировать HLA-DR. Помимо таких маркеров клеточной поверхности, MDSC характеризуются способностью подавлять иммунные клетки, такие как Т-клетки, NK-клетки и В-клетки. Иммуносупрессивные функции MDSC могут включать в себя ингибирование антиген-неспецифической функции и ингибирование антиген-специфической функции. MDSC могут экспрессировать LRRC33 клеточной поверхности и/или LRRC33-proTGFβ1.

[158] *Миофибробласты:* Миофибробласты представляют собой клетки с определенными фенотипами фибробластов и гладкомышечных клеток, которые обычно экспрессируют виментин, альфа-актин гладких мышц (α-SMA; человеческий ген ACTA2) и паладин. Во многих болезненных состояниях, связанных с дисрегуляцией внеклеточного матрикса (например, с повышенной жесткостью матрикса), нормальные клетки

фибробластов де-дифференцируются в миофибробласты зависимым от TGFβ образом. Аберрантная избыточная экспрессия TGFβ часто встречается среди патологий, вызванных миофибробластами. Известно, что TGFβ способствует дифференцировке миофибробластов, пролиферации клеток и продукции матрикса. Миофибробласты или миофибробластоподобные клетки в фиброзном микроокружении могут называться ассоциированными с фиброзом фибробластами (или «FAF»), а миофибробласты или миофибробластоподобные клетки в микроокружении опухоли могут называться ассоциированными с раком фибробластами (или «CAF»).

[159] *Неселективный ингибитор (пан-ингибитор) TGFβ/неселективное ингибирование TGFβ:* Термин «неселективный ингибитор TGFβ» относится к любому средству, который способен ингибировать или антагонизировать все три изоформы TGFβ. Такой ингибитор может являться низкомолекулярным ингибитором изоформ TGFβ, таких как известные в настоящей области техники. Термин включает в себя неселективное антитело к TGFβ, которое относится к любому антителу, способному связываться с каждой из изоформ TGFβ, т.е. TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления неселективное антитело к TGFβ связывает и нейтрализует активности всех трех изоформ, т.е. TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3. Антитело 1D11 (или человеческий аналог фрезолимумаб (GC1008)) представляет собой хорошо известный пример неселективного антитела к TGFβ, которое нейтрализует все три изоформы TGFβ. Примеры низкомолекулярных неселективных ингибиторов TGFβ включают в себя галунисертиб (моногидрат LY2157299), который является антагонистом киназы рецептора I TGFβ/ALK5, который опосредует передачу сигналов всех трех изоформ TGFβ.

[160] *Периваскулярная (инфильтрация):* Приставка «пери-» означает «вокруг», «окружающий» или «рядом», следовательно, «периваскулярный» буквально переводится как «вокруг кровеносных сосудов». Используемый в настоящем документе в контексте инфильтратов опухолевых клеток, термин «периваскулярная инфильтрация» относится к способу проникновения инфильтрирующих опухоль иммунных клеток (например, лимфоцитов) через сосудистую сеть солидной опухоли.

[161] *Эффективность:* Используемый в настоящем документе термин «эффективность» относится к активности лекарственного средства, такого как ингибирующее антитело (или фрагмент), обладающее ингибирующей активностью, в отношении концентрации или количества лекарственного средства, вызывающего определенный эффект. Например, антитело, способное вызывать определенные эффекты при данной дозировке, является более эффективным, чем другое антитело, которое требует вдвое большего количества (дозировки) для получения эквивалентных эффектов.

Эффективность можно измерить в анализах на основе клеток, таких как анализы активации/ингибирования TGFβ, посредством чего степень активации TGFβ, например активация, запускаемая связыванием интегрина, может быть измерена в присутствии или при отсутствии исследуемого препарата (например, ингибирующих антител) в системе на основе клеток. Как правило, среди антител, способных связываться с одними и теми же или перекрывающимися связывающими областями антигена (например, перекрестно-блокирующие антитела), антитела с более высокой аффинностью (более низкие значения K_D) имеют тенденцию проявлять более высокую эффективность, чем антитела с более низкими аффинностями (более высокие значения K_D).

[162] *Презентирующая молекула:* Презентирующие молекулы в контексте настоящего раскрытия относятся к белкам, которые образуют ковалентные связи с латентными пропротеинами (например, proTGFβ1) и связывают («презентируют») неактивный комплекс с внеклеточной нишей (такой как ECM или поверхность иммунных клеток), тем самым сохраняя свою латентность до тех пор, пока не произойдет событие активации. Известные презентирующие молекулы для proTGFβ1 включают в себя: LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33, каждая из которых может образовывать комплекс презентирующая молекула-proTGFβ1 (т.е. LLC), а именно LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1 соответственно. По своей природе LTBP1 и LTBP3 являются компонентами внеклеточного матрикса (ECM); следовательно, LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ1 могут вместе называться «ассоциированными с ECM» (или «ассоциированными с матриксом») комплексами proTGFβ1, которые опосредуют передачу сигналов/активности TGFβ1, ассоциированных с ECM. GARP и LRRC33, с другой стороны, представляют собой трансмембранные белки, экспрессируемые на клеточной поверхности определенных клеток; следовательно, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1 могут вместе называться «ассоциированными с клеткой» (или «ассоциированными с клеточной поверхностью») комплексами proTGFβ1, которые опосредуют ассоциированную с клеткой (например, ассоциированную с иммунными клетками) передачу сигналов/активности TGFβ1.

[163] *Защита (от воздействия растворителя):* В контексте оценки белок-белковых взаимодействий на основе HDX-MS, таких как связывание антитело-антиген, степень, в которой белок (например, область белка, содержащая эпитоп) подвергается воздействию растворителя, тем самым позволяя происходить протонному обмену, обратно коррелирует со степенью связывания/взаимодействия. Следовательно, когда описанное в настоящем документе антитело связывается с областью антигена, область связывания «защищена» от воздействия растворителя, поскольку белок-белковое взаимодействие

препятствует доступу области связывания для окружающего растворителя. Таким образом, защищенная область указывает на место взаимодействия. Как правило, подходящими растворителями являются физиологические буферы.

[164] *ProTGFβ1:* Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин «proTGFβ1» охватывает формы-предшественники неактивного комплекса TGFβ1, который содержит последовательность продомена TGFβ1 в составе комплекса. Таким образом, термин может включать в себя как про-, так и латентные формы TGFβ1. Выражение «про/латентный TGFβ1» может использоваться взаимозаменяемо. «Про» форма TGFβ1 существует до протеолитического расщепления на сайте фурина. После расщепления полученная форма называется «латентной» формой TGFβ1. «Латентный» комплекс остается нековалентно связанным до тех пор, пока не будет запущена дальнейшая активация, например событие активации, управляемое интегрином. Комплекс proTGFβ1 состоит из полипептидов димерного пропротеина TGFβ1, связанных дисульфидными связями. Латентный димерный комплекс ковалентно связан с одной презентирующей молекулой через остаток цистеина в положении 4 (Cys4) каждого из полипептидов proTGFβ1. Прилагательное «латентный» можно использовать в целом/широко для описания «неактивного» состояния TGFβ1 до опосредованной интегрином активации или других событий активации. Полипептид proTGFβ1 содержит продомен (LAP) и домен фактора роста (SEQ ID NO: 146).

[165] *Регрессия (регрессия опухоли):* Регрессия опухоли или роста опухоли может быть использована в качестве меры эффективности in vivo. Например, в доклинических условиях медианный объем опухоли (MTV) и критерии эффективности лечения по регрессионным ответам можно определить по объемам опухолей животных, оставшихся в исследовании в последний день. Эффективность лечения также можно определить по частоте и величине регрессионных ответов, наблюдаемых во время исследования. Лечение может вызвать частичную регрессию (PR) или полную регрессию (CR) опухоли у животного. Полная регрессия, достигнутая в ответ на терапию (например, введение лекарственного средства), может называться «*полный ответ*», а субъект, который достигает полного ответа, может упоминаться как «*полностью ответивший на терапию*». Таким образом, полный ответ исключает в себя *спонтанную* полную регрессию. Согласно некоторым вариантам осуществления доклинических моделей опухолей PR-ответ определяется как объем опухоли, который составляет 50% или меньше ее объема в день 1 для трех последовательных измерений в ходе исследования и равен или превышает 13,5 мм^3 для одного или больше этих трех измерений. Согласно некоторым вариантам осуществления CR-ответ определяется как объем опухоли, который составляет менее 13,5

мм^3 для трех последовательных измерений в ходе исследования. В доклинической модели животное с ответом CR на момент окончания исследования может быть дополнительно классифицировано как выжившее без опухоли (TFS). Термин «эффективный контроль опухоли» может использоваться для обозначения степени регрессии опухоли, достигаемой в ответ на лечение, где, например, объем опухоли уменьшается до <25% от предварительно установленного конечного объема опухоли в ответ на лечение. Например, в конкретной модели, если предварительно установленный конечный объем опухоли составляет 2000 мм^3, эффективный контроль опухоли достигается, если опухоль уменьшается до менее чем 500 мм^3. Следовательно, эффективный контроль опухоли включает в себя полную регрессию, а также частичную регрессию, которая достигает порогового снижения.

[166] *Регуляторные Т-клетки:* «Регуляторные Т-клетки», или Treg, представляют собой тип иммунных клеток, характеризующийся экспрессией биомаркеров CD4, FOXP3 и CD25. Treg иногда называют супрессорными Т-клетками и представляют собой субпопуляцию Т-клеток, которые модулируют иммунную систему, поддерживают толерантность к аутоантигенам и предотвращают аутоиммунные заболевания. Treg являются иммуносупрессивными и, как правило, подавляют или отрицательно регулируют индукцию и пролиферацию эффекторных Т-клеток (Teff). Treg могут развиваться в тимусе (так называемые CD4+ Foxp3+ «естественные» Treg) или дифференцироваться от наивных CD4+ Т-клеток на периферии, например, после воздействия TGFβ или ретиноевой кислоты. Treg могут экспрессировать GARP-proTGFβ1 на клеточной поверхности.

[167] *Устойчивость (к терапии):* Устойчивость к определенной терапии (например, СВТ) может быть связана с присущими заболеванию характеристиками, такого как рак («первичная устойчивость»), или с приобретенными фенотипами, которые развиваются с течением времени после лечения («приобретенная устойчивость»). Считается, что пациенты, которые не проявляют терапевтического ответа на терапию (например, те, кто не отвечает или плохо отвечает на терапию), имеют первичную устойчивость к терапии. Считается, что пациенты, у которых первоначально проявляется терапевтический ответ на терапию, но позже теряются эффекты (например, прогрессирование или рецидив, несмотря на продолжающуюся терапию), характеризуются наличием приобретенной устойчивости к терапии.

[168] *Критерии оценки ответа при солидных опухолях (RECIST) и iRECIST:* RECIST представляет собой набор опубликованных правил, которые определяют, когда опухоли у онкологических больных улучшаются («отвечают»), остаются прежними («стабилизируются») или ухудшаются («прогрессирование») во время лечения. Критерии были опубликованы в феврале 2000 года в результате международного сотрудничества,

включая в себя Европейскую организацию по исследованию и лечению рака (EORTC), Национальный институт рака США и Группу клинических испытаний Национального института рака Канады. Впоследствии пересмотренная версия руководства RECIST (RECIST v 1,1) была широко адаптирована (см.: Eisenhauera et al. (2009), «New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1)» Eur J Cancer 45: 228-247, включенная в настоящий документ).

[169] Критерии ответа следующие: Полный ответ (CR): исчезновение всех целевых поражений; Частичный ответ (ЧО): по меньшей мере 30% уменьшение суммы LD целевых поражений, принимая в качестве эталона исходную сумму LD; стабильное заболевание (SD): ни достаточное уменьшение размеров, чтобы соответствовать критериям PR, ни достаточное увеличение, чтобы соответствовать критериям PD, принимая в качестве эталона наименьшую сумму LD с момента начала лечения; прогрессирующее заболевание (PD): увеличение суммы LD целевых поражений по меньшей мере на 20%, принимая в качестве эталона наименьшую сумму LD, зарегистрированную с момента начала лечения или появления одного или нескольких новых поражений.

[170] С другой стороны, iRECIST предоставляет модифицированный набор критериев, который учитывает иммунный ответ (см.: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5648544/, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки). Критерии RECIST и iRECIST стандартизированы, могут время от времени пересматриваться по мере появления новых данных и хорошо известны в настоящей области техники.

[171] *Солидная опухоль:* Термин «солидная опухоль» относится к пролиферативным нарушениям, приводящим к аномальному росту или массе ткани, которая, как правило, не содержит кист или жидких участков. Солидные опухоли могут быть доброкачественными (незлокачественными) или злокачественными (раковыми). К солидным опухолям относятся опухоли распространенных злокачественных новообразований, такие как местнораспространенные солидные опухоли и метастатический рак. Солидные опухоли, как правило, состоят из нескольких типов клеток, включая в себя без ограничения раковые (злокачественные) клетки, стромальные клетки, такие как CAF, и инфильтрирующие лейкоциты, такие как макрофаги, MDSC и лимфоциты. Солидные опухоли, подлежащие лечению селективным в отношении изоформы ингибитором TGFβ1, таким как описанные в настоящем документе, как правило, являются TGFβ1-положительными (TGFβ1+) опухолями, которые могут включать в себя несколько типов клеток, продуцирующих TGFβ1. Согласно определенным вариантам осуществления TGFβ1+ опухоль может также коэкспрессировать TGFβ3 (т.е. TGFβ3-положительная).

Например, некоторые опухоли являются ко-доминантными по TGFβ1/3. Согласно некоторым вариантам осуществления такие опухоли вызваны раком эпителиальных клеток, например карциномой.

[172] *Титрование равновесного раствора (SET):* SET представляет собой анализ, с помощью которого можно измерить связывание двух молекул (таких как, антиген и антитело, связывающее антиген) в равновесном состоянии в растворе. Например, SET на основе Meso-Scale Discovery (MSD), или MSD-SET, является применимым способом определения констант диссоциации для особо высокоаффинных белок-белковых взаимодействий в равновесии, таких как связывание антител с пикомолярной аффинностью с их антигенами (см., например: Ducata et al. (2015) J Biomolecular Screening 20 (10): 1256-1267). Анализы на основе SET являются особенно применимыми для определения значений K_D антител с субнаномолярными (например, пикомолярными) аффинностями.

[173] *Специфическое связывание:* Используемый в настоящем документе термин «специфическое связывание» или «специфически связывает» означает, что взаимодействие антитела или его антигенсвязывающей части с антигеном зависит от наличия конкретной структуры (например, антигенная детерминанта или эпитоп). Например, антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с конкретным белком, а не с белками в целом. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связывается с мишенью, например, TGFβ1, если антитело характеризуется KD для мишени по меньшей мере приблизительно 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M или меньше. Согласно некоторым вариантам осуществления используемый в настоящем документе термин «специфическое связывание с эпитопом proTGFβ1», «специфически связывается с эпитопом proTGFβ1», «специфическое связывание с proTGFβ1» или «специфически связывается с proTGFβ1» относится к антителу или его антигенсвязывающей части которые связываются с proTGFβ1 и характеризуются константой диссоциации (K_D), составляющей $1,0 \times 10^{-8}$ M или менее, как определено подходящими анализами связывания in vitro, такими как поверхностный плазмонный резонанс и биослойная интерферометрия (BLI). Согласно одному варианту осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть может специфически связываться как с человеческими, так и с не относящимися к человеку (например, мышами) ортологами proTGFβ1.

[174] *Субъект:* Термин «субъект» в контексте терапевтического применения относится к индивидууму, который получает клиническую помощь или вмешательство, такое как лечение, диагностика и т.д. Подходящие субъекты включают в себя позвоночных, включая в себя без ограничения млекопитающих (например, человека и млекопитающих,

кроме человека). Если субъектом является субъект-человек, термин «пациент» может использоваться взаимозаменяемо. В клиническом контексте термин «популяция пациентов» или «субпопуляция пациентов» используется для обозначения группы лиц, подпадающих под набор критериев, таких как клинические критерии (например, проявления болезни, стадии заболевания, подверженность определенным состояниям, реакция на терапию и т. д.), история болезни, состояние здоровья, пол, возрастная группа, генетические критерии (например, носитель определенной мутации, полиморфизма, дупликаций генов, повторов последовательностей ДНК и т.д.) и факторы образа жизни (например, курение , употребление алкоголя, физические упражнения и т.д.).

[175] *Поверхностный плазмонный резонанс (SPR):* Поверхностный плазмонный резонанс представляет собой оптическое явление, которое позволяет обнаруживать немеченые взаимодействующие вещества в реальном времени. Биосенсоры на основе SPR, такие как те, которые коммерчески доступны от Biacore, можно использовать для измерения биомолекулярных взаимодействий, включая в себя взаимодействия белок-белок, такие как связывание антиген-антитело. Технология широко известна в настоящей области техники и применима для определения таких параметров, как аффинность связывания, кинетические константы скорости и термодинамика.

[176] *Показание, связанное с TGFβ1:* «Показание, связанное с TGFβ1» представляет собой нарушение, ассоциированное с TGFβ1, и означает любое заболевание или нарушение, и/или состояние, при котором по меньшей мере часть патогенеза и/или прогрессирования связана с передачей сигналов TGFβ1 или нарушением ее регуляции. Определенные нарушения, ассоциированные с TGFβ1, вызываются преимущественно изоформой TGFβ1. Субъекты, имеющие показания, связанные с TGFβ1, могут получить положительный эффект от ингибирования активности и/или уровней TGFβ1. Определенные показания, связанные с TGFβ1, обусловлены преимущественно изоформой TGFβ1. Показания, связанные с TGFβ1, включают в себя без ограничения: фиброзные состояния (такие как фиброз органов и фиброз тканей, вызывающих хроническое воспаление), пролиферативные нарушения (такие как рак, например, солидные опухоли и миелофиброз), заболевания, ассоциированные с дисрегуляцией ECM (такие как состояния, характеризующиеся повышением жесткости и ремоделированием матрикса), заболевание, характеризующееся мезенхимальным переходом (например, EndMT и/или EMT), заболевание, связанное с протеазами, заболевание с аберрантной генной экспрессией определенных маркеров, описанных в настоящем документе. Эти категории заболеваний не являются взаимоисключающими.

[177] *Ингибитор TGFβ:* Термин «ингибитор TGFβ» относится к любому средству, способному противодействовать биологической активности, передаче сигналов или функции фактора роста TGFβ (например, TGFβ1, TGFβ2 и/или TGFβ3). Подразумевается, что этот термин не ограничен механизмом действия и включает в себя, например, нейтрализующие ингибиторы, антагонисты рецепторов, ловушки растворимых лигандов и ингибиторы активации TGFβ. Ингибиторы TGFβ также включают в себя антитела, которые способны снижать доступность латентного proTGFβ, который может быть активирован в нише, например, путем индукции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADPC), а также антитела, которые приводят к интернализации комплекса клеточной поверхности, содержащего латентный proTGFβ, тем самым удаляя предшественник с плазматической мембраны без истощения самих клеток. Интернализация может являться подходящим механизмом действия для LRRC33-содержащих белковых комплексов (таких как человеческий LRRC33-proTGFβ1), что приводит к снижению уровней клеток, экспрессирующих LRRC33-содержащие белковые комплексы на поверхности клетки.

[178] «*Семейство TGFβ*» представляет собой класс внутри суперсемейства TGFβ и у человека он содержит три представителя: TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3, которые являются структурно подобными. Известно, что три фактора роста передают сигнал через одни и те же рецепторы.

[179] *GFβ1-положительный рак/опухоль:* Используемый в настоящем документе термин относится к раку/опухоли с аберрантной экспрессией TGFβ1 (избыточная экспрессия). Многие типы рака/опухоли человека демонстрируют преобладающую экспрессию изоформы TGFβ1 (обратите внимание, что «TGFB» иногда используется для обозначения гена, а не белка). В некоторых случаях такой рак/опухоль может демонстрировать ко-доминантную экспрессию другой изоформы, такой как TGFβ3. Ряд эпителиальных форм рака (например, карцинома) могут коэкспрессировать TGFβ1 и TGFβ3. В окружении опухоли TGFβ1-положительных опухолей TGFβ1 может возникать из нескольких источников, включая в себя, например, раковые клетки, опухолевые макрофаги (TAM), ассоциированные с раком фибробласты (CAF), регуляторные Т-клетки (Treg), супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) и окружающий внеклеточный матрикс (ECM). В контексте настоящего раскрытия доклинические модели рака/опухоли, которые воспроизводят состояния человека, представляют собой TGFβ1-положительный рак/опухоль.

[180] *Терапевтическое окно:* Термин «терапевтическое окно» относится к диапазону дозировок, который вызывает терапевтический ответ, не вызывая

значительного/наблюдаемого/неприемлемого нежелательного эффекта (например, в пределах приемлемых или переносимых нежелательных эффектов) у субъектов. Терапевтическое окно можно рассчитать как отношение минимальных эффективных концентраций (MEC) к минимальным токсическим концентрациям (MTC). Для иллюстрации ингибитор TGFβ1, который достигает эффективности in vivo при дозировке 10 мг/кг и демонстрирует переносимость или приемлемую токсичность при 100 мг/кг, обеспечивает по меньшей мере 10-кратное (например, 10×) терапевтическое окно. Напротив, неселективный ингибитор TGFβ, который эффективен при дозе 10 мг/кг, но вызывает нежелательные эффекты при дозе, меньшей, чем эффективная, как говорят, имеет «ограничивающую дозу токсичность». Как правило, максимально переносимая доза (MTD) может устанавливать верхний предел терапевтического окна.

[181] Например, было показано, что Ab6 эффективен при дозировке в диапазоне от 3 до 30 мг/кг в неделю, а также не обладает наблюдаемой токсичностью, ассоциированной с неселективным ингибированием TGFβ при дозировке, составляющей по меньшей мере 100 или более. 300 мг/кг/неделя в течение 4 недель у крыс или не являющихся человеком приматов. Исходя из этого, Ab6 показывает терапевтического окна как минимум от 3,3-кратного и вплоть до 100-кратного.

[182] *Токсичность:* Используемый в настоящем документе термин «токсичность» или «токсичности» относится к нежелательным эффектам in vivo у субъектов (например, пациентов), ассоциированным с терапией, вводимой субъектам (например, пациентам), таким как нежелательные побочные эффекты и нежелательные эффекты. «Переносимость» относится к уровню токсичностей, ассоциированных с терапией или схемой лечения, который может быть приемлемым для пациентов без прекращения терапии из-за токсичностей. Как правило, исследования токсичности/токсикологии проводят на одной или нескольких доклинических моделях до клинической разработки для оценки профилей безопасности лекарственного средства-кандидата (например, терапии моноклональными антителами). Исследования токсичности/токсикологии могут помочь определить «доза, не приводящая к развитию наблюдаемого нежелательного эффекта (NOAEL)» и «максимально переносимую дозу (MTD)» исследуемого препарата, на основании которых можно вывести значение терапевтического окна. Предпочтительно, вид, который, как показано, является чувствительным к конкретному вмешательству, должен быть выбран в качестве доклинической модели на животных, на которой должно проводиться исследование безопасности/токсичности. В случае ингибирования TGFβ подходящие виды включают в себя крыс, собак и яванских макак. Сообщается, что мыши менее чувствительны к фармакологическому ингибированию TGFβ и могут не проявлять

токсичности, которая потенциально опасна для других видов, включая в себя человека, хотя в некоторых исследованиях сообщается о токсичности, наблюдаемой при неселективном ингибировании TGFβ у мышей. Чтобы проиллюстрировать в контексте настоящего раскрытия, NOAEL для Ab6 у крыс являлся самой высокой оцененной дозой (100 мг/кг), позволяя предположить, что MTD составляет > 100 мг/кг, на основании четырехнедельного токсикологического исследования. MTD Ab6 у приматов, кроме человека, составляет > 300 мг/кг на основании четырехнедельного токсикологического исследования.

[183] Для определения NOAEL и MTD предпочтительно, чтобы вид, являющихся, как было показано, чувствительным к конкретному вмешательству, был выбран в качестве доклинической модели на животных, на которой должно проводиться исследование безопасности/токсикологии. В случае ингибирования TGFβ подходящие виды включают в себя без ограничения крыс, собак и яванских макак. Сообщается, что мыши менее чувствительны к фармакологическому ингибированию TGFβ и могут не проявлять токсичности, которая является потенциально серьезной или опасной для других видов, включая в себя человека.

[184] *Возможность интерпретации (полученных данных) применительно к другому контексту:* в контексте открытия лекарственных средств и клинических разработок термин «возможность интерпретации полученных данных применительно к другому контексту» или «интерпретируемый применительно к другому контексту» относится к определенному качеству или свойству доклинических моделей или данных, которые воспроизводят условия организма человека. Используемое в настоящем документе доклиническая модель, которая воспроизводит показание TGFβ1, как правило, показывает преобладающую экспрессию TGFB1 (или TGFβ1) по сравнению с TGFB2 (или TGFβ2) и TGFB3 (или TGFβ3). В парадигмах комбинированной терапии, например, возможность интерпретации полученных данных применительно к другому контексту может потребовать тех же лежащих в основе механизмов действия, которые комбинация активных веществ стремится реализовать в модели. Например, многие опухоли человека являются TGFβ1-положительными опухолями с иммунным исключением, которые проявляют первичную устойчивость к терапии блокадой контрольных точек (CBT). Вторую терапию (например, ингибиторы TGFβ1) можно использовать в комбинации для преодоления устойчивости к CBT. В этом сценарии подходящие интерпретируемые применительно к другому контексту доклинические модели включают в себя TGFβ1-положительные опухоли, которые проявляют первичную устойчивость к терапии блокадой контрольных точек (CBT).

[185] *Лечить/лечение:* Термин «лечение» или «лечение» включает в себя терапевтические методы лечения, профилактические методы лечения и применения, в которых снижается риск того, что у субъекта разовьется нарушение или другой фактор риска. Таким образом, этот термин предназначен для широкого обозначения: причинение терапевтического эффекта пациенту, например, путем усиления или повышения иммунитета организма; снижение или устранение подавления иммунитета; уменьшение, удаление или уничтожение вредных клеток или веществ из организма; снижение бремени болезни (например, опухолевой массы); предотвращение повторного проявления или рецидива; продление рефрактерного периода и/или иное улучшение выживаемости. Термин включает в себя терапевтическое лечение, профилактическое лечение и применения, в которых снижается риск того, что у субъекта разовьется нарушение или другой фактор риска. Лечение не требует полного излечения нарушения и включает в себя варианты осуществления, в которых уменьшаются симптомы или основные факторы риска. В контексте комбинированной терапии этот термин может также относиться к: i) способности второго терапевтического средства снижать эффективную дозировку первого терапевтического средства, чтобы уменьшить побочные эффекты и повысить переносимость; ii) способности второй терапии сделать пациента более восприимчивым к первой терапии; и/или iii) способности оказывать дополнительные или синергетические благоприятные клинические эффекты.

[186] *Макрофаги, ассоциированные с опухолью (TAM):* TAM представляют собой поляризованные/активированные макрофаги с проопухолевыми фенотипами (M2-подобные макрофаги). TAM могут являться либо происходящими из костного мозга моноцитами/макрофагами, рекрутированными в место опухоли, либо резидентными в ткани макрофагами, происходящими из эритромиелоидных предшественников. Дифференцировка моноцитов/макрофагов в TAM зависит от ряда факторов, включая в себя местные химические сигналы, такие как цитокины, хемокины, факторы роста и другие молекулы, которые действуют как лиганды, а также межклеточные взаимодействия между моноцитами/макрофагами, присутствующими в нише (микроокружении опухоли). Как правило, моноциты/макрофаги могут быть поляризованы на так называемые подтипы «M1» или «M2», причем последний связан с более проопухолевым фенотипом. В солидной опухоли вплоть до 50% массы опухоли может соответствовать макрофагам, которые предпочтительно являются M2-поляризованными. Среди ассоциированных с опухолью моноцитов и популяций миелоидных клеток макрофаги M1, как правило, экспрессируют HLA-DR, CD68 и CD86 клеточной поверхности, тогда как макрофаги M2, как правило, экспрессируют HLA-DR, CD68, CD163 и CD206 клеточной поверхности. Ассоциированные

с опухолью M2-подобные макрофаги (такие как подтипы M2c и M2d) могут экспрессировать LRRC33 и/или LRRC33-proTGFβ1 клеточной поверхности.

[187] *Микроокружение опухоли:* Термин «микроокружение опухоли (TME)» относится к местной нише заболевания, в которой опухоль (например, солидная опухоль) находится in vivo. TME может содержать ассоциированную с заболеванием молекулярную сигнатуру (набор хемокинов, цитокинов и т.д.), популяции ассоциированных с заболеванием клеток (такие как TAM, CAF, MDSC и т.д.), а также среды ассоциированного с заболеванием ECM (изменения в компонентах и/или структуре ECM).

[188] *Вариабельная область:* Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к части легкой и/или тяжелой цепей антитела, как правило, включающей в себя приблизительно 120-130 аминоконцевых аминокислот в тяжелой цепи и приблизительно 100-110 аминокислотных концевых аминокислот в легкой цепи. Согласно определенным вариантам осуществления вариабельные области разных антител сильно различаются по аминокислотной последовательности даже среди антител одного и того же вида. Вариабельная область антитела, как правило, определяет специфичность конкретного антитела в отношении его мишени.

[189] За исключением рабочих примеров или там, где указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов или условия реакции, используемые в настоящем документе, следует понимать как измененные во всех случаях термином «приблизительно». Термин «приблизительно», когда он используется в связи с процентами, может означать ± 1%.

[190] Используемые в настоящем документе в описании и формуле изобретения, если явно не указано иное, формы единственного числа следует понимать как «по меньшей мере один».

[191] Используемая в настоящем документе в описании и формуле изобретения фраза «и/или» следует понимать как означающую «один или оба» из соединенных таким образом элементов, т.е. элементов, которые в некоторых случаях присутствуют вместе и раздельно присутствуют в других случаях. Необязательно могут присутствовать и другие элементы, отличные от элементов, специально обозначенных условием «и/или», независимо от того, связаны они или не связаны с теми элементами, которые конкретно определены, если явно не указано иное. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на «A и/или B» при использовании в сочетании с неограничивающей формулировкой, такой как «содержащий», может относиться, согласно одному варианту осуществления, к A без B (необязательно включая элементы, другие чем B); в другом варианте осуществления до B без A (необязательно включая в себя элементы, отличные от

A); согласно еще одному варианту осуществления как к A, так и к B (необязательно включая в себя другие элементы); и т.п.

[192] Используемую в настоящем документе в описании и формуле изобретения фразу «по меньшей мере один» применительно к перечню из одного или нескольких элементов следует понимать как означающую по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или нескольких элементов в перечне элементов, но не обязательно включая в себя по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно перечисленного в перечне элементов, и не исключая любые комбинации элементов в перечне элементов. Это определение также допускает, что могут необязательно присутствовать элементы помимо элементов, специально идентифицированных в перечне элементов, к которым относится фраза «по меньшей мере один», независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно идентифицированными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера «по меньшей мере один из A и B» (или, эквивалентно, «по меньшей мере один из A или B», или, что эквивалентно, «по меньшей мере один из A и/или B») может относиться, согласно одному варианту осуществления, по меньшей мере к одному, необязательно включая в себя более одного, A, без присутствия B (и необязательно включая в себя элементы, отличные от B); согласно другому варианту осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включая в себя более одного, B, без присутствия A (и необязательно включая в себя элементы, отличные от A); согласно еще одному варианту осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включая в себя более одного A, и по меньшей мере одному, необязательно включая в себя более одного B (и необязательно включая в себя другие элементы); и т.п.

[193] Использование порядковых терминов, таких как «первый», «второй», «третий» и т.д., в формуле изобретения для модификации заявленного элемента само по себе не означает какого-либо приоритета, преимущественного значения или порядка одного заявленного элемента над другим или временной порядок, в котором выполняются действия способа, но используются просто как метки, чтобы отличить один заявленный элемент, имеющий определенное название, от другого элемента, имеющего такое же название (но для использования порядкового термина), чтобы отличить заявленные элементы.

[194] Следует понимать, что представленные в настоящем документе диапазоны являются сокращением для всех значений в пределах диапазона. Например, подразумевается, что диапазон от 1 до 50 включает в себя любое число, комбинацию чисел или поддиапазон из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,

18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50, например, 10-20, 1-10, 30-40 и т.д.

Трансформирующий фактор роста бета (TGFβ)

[195] Активности трансформирующего фактора роста бета (TGFβ) и последующая частичная очистка растворимых факторов роста были впервые описаны в конце 1970-х - начале 1980-х годов, с чего началась область исследований TGFβ около 40 лет назад. На сегодняшний день идентифицировано 33 генных продукта, которые составляют большое суперсемейство TGFβ. Суперсемейство TGFβ может быть разделено по меньшей мере на три подкласса по структурному сходству: TGFβ, факторы дифференцировки и роста (GDF) и костные морфогенетические белки (BMP). Подкласс TGFβ состоит из трех высококонсервативных изоформ, а именно TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3, которые кодируются у человека тремя отдельными генами.

[196] Считается, что TGFβ играют ключевую роль в различных процессах, таких как ингибирование пролиферации клеток, ремоделирование внеклеточного матрикса (ECM) и иммунный гомеостаз. Важность TGFβ1 для гомеостаза Т-клеток демонстрируется наблюдением, что мыши TGFβ1 -/- выживают только 3-4 недели, погибая от полиорганной недостаточности из-за массивной иммунной активации (Kulkarni, A.B., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(2): p. 770-4; Shull, M.M., et al., Nature, 1992. 359(6397): p. 693-9). Роли TGFβ2 и TGFβ3 менее ясны. Хотя три изоформы TGFβ имеют разные временные и пространственные профили экспрессии, они передают сигнал через одни и те же рецепторы, TGFβRI и TGFβRII, хотя в некоторых случаях, например, для передачи сигналов TGFβ2, также требуются рецепторы типа III, такие как бетагликан (Feng, X.H. and R. Derynck, Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. 21: p. 659-93; Massague, J., Annu Rev Biochem, 1998. 67: p. 753-91). Индуцированная лигандом олигомеризация TGFβRI/II запускает фосфорилирование факторов транскрипции SMAD, что приводит к транскрипции генов-мишеней, таких как Col1a1, Col3a1, ACTA2 и SERPINE1 (Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton, Genes Dev, 2005. 19(23): p. 2783-810). SMAD-независимые пути передачи сигналов TGFβ также описаны, например, при раке или поражении аорты у мышей Marfan (Derynck, R. and Y.E. Zhang, Nature, 2003. 425(6958): p. 577-84; Holm, T.M., et al., Science, 2011. 332(6027): p. 358-61).

[197] Биологическое значение пути TGFβ у людей подтверждено генетическими заболеваниями. Болезнь Камурати-Энгельмана приводит к дисплазии костей из-за аутосомно-доминантной мутации в гене TGFB1, что приводит к конститутивной активации передачи сигналов TGFβ1 (Janssens, K., et al., J Med Genet, 2006. 43(1): p. 1-11). Пациенты с синдромом Лойса/Дитца несут аутосомно-доминантные мутации в компонентах

сигнального пути TGFβ, которые вызывают аневризму аорты, гипертелоризм и расщепление небного язычка (Van Laer, L., H. Dietz, and B. Loeys, Adv Exp Med Biol, 2014. 802: p. 95-105). Поскольку дисрегуляция пути TGFβ связано с множеством заболеваний, несколько лекарственных средств, нацеленных на путь TGFβ, были разработаны и протестированы на пациентах, но с ограниченным успехом.

[198] Дисрегуляция передачи сигналов TGFβ было ассоциировано с широким спектром заболеваний человека. Действительно, при ряде болезненных состояний такое дисрегуляция может охватывать несколько аспектов функции TGFβ. Пораженная ткань, такая как фиброзные и/или воспаленные ткани и опухоли, могут создавать локальную среду, в которой активация TGFβ может вызывать обострение или прогрессирование заболевания, что, по меньшей мере частично может быть опосредовано взаимодействиями между множеством TGFβ-чувствительных клеток, которые активируются аутокринным и/или паракринным образом, вместе с рядом других цитокинов, хемокинов и факторов роста, которые играют роль в конкретном заболевании.

[199] Например, микроокружение опухоли (TME) содержит несколько типов клеток, экспрессирующих TGFβ1, таких как активированные миофибробластоподобные фибробласты, стромальные клетки, инфильтрирующие макрофаги, MDSC и другие иммунные клетки, в дополнение к раковым (т.е. злокачественным) клеткам. Таким образом, TME представляет собой гетерогенную популяцию клеток, экспрессирующих и/или ответивших на TGFβ1, но в ассоциации с более чем одним типом презентирующих молекул, например, LTBP1, LTBP3, LRRC33 и GARP, в нише.

[200] Достижения в области иммунотерапии изменили ландшафт эффективного лечения растущего числа онкологических пациентов. Наиболее известными являются методы лечения блокадой контрольных точек (CBT), которые теперь стали частью стандартных схем лечения растущего числа раковых заболеваний. Хотя выраженные и стойкие ответы на CBT наблюдаются при растущем числе типов рака, теперь ясно, что значительная часть опухолей, по-видимому, невосприимчива к CBT даже в начале лечения, что указывает на первичную устойчивость как на серьезную проблему, которая заключается в том, чтобы позволить иммунной системе многих пациентов нацеливаться и уничтожать опухолевые клетки. Были предприняты попытки понять и устранить основные механизмы, обеспечивающие первичную устойчивость к CBT, чтобы повысить эффективность лечения для большего числа пациентов. Однако этот энтузиазм был сдержан из-за невысоких результатов клинических испытаний и неудач при сочетании CBT со средствами, которые, как известно, влияют на тот же тип опухоли или модулируют, казалось бы, соответствующие компоненты иммунной системы. Вероятная причина

заключается в том, что четкое механистическое обоснование данной комбинации часто не основано на клинических данных и, таким образом, привело к неопределенным и противоречивым результатам в испытаниях, направленных на усиление одобренных монотерапевтических видов лечения. Стало ясно, что разработка комбинированной иммунотерапии должна основываться на научных данных, имеющих отношение к обусловливающей биологии опухоли и иммунной системы.

[201] Недавно в употребление был введен феномен, называемый «иммунная эксклюзия», для описания окружения опухоли, от которого противоопухолевые эффекторные Т-клетки (например, CD8 + Т-клетки) держатся в отдалении (следовательно, «исключаются») с помощью иммуносупрессивных местных сигналов. Совсем недавно ряд ретроспективных анализов опухолей клинического происхождения показал, что активация пути TGFβ участвует в опосредовании первичной устойчивости к СВТ. Например, определение профилей транскрипции и анализ биопсий меланомы до лечения выявили обогащение TGFβ-ассоциированных путей и биологических процессов в опухолях, которые не отвечают на СВТ с помощью антитела к PD-1. В опухоли с иммунным исключением эффекторные клетки, которые в противном случае были бы способны атаковать раковые клетки путем распознавания опухолевых антигенов на клеточной поверхности, предотвращается доступ к участку раковых клеток. Таким образом, раковые клетки ускользают от иммунитета хозяина и иммуноонкологических терапевтических средств, таких как ингибиторы контрольных точек, которые используют такой иммунитет и полагаются на него. Действительно, такие опухоли проявляют устойчивость к ингибированию контрольных точек, например, антителам к PD-1 и к PD-L1, предположительно потому, что заблокировано проникновение целевых Т-клеток в опухоль, следовательно, они не могут оказывать противораковые эффекты.

[202] Ряд ретроспективных анализов опухолей клинического происхождения указывает на активацию пути TGFβ в опосредовании первичной устойчивости к СВТ. Например, определение профилей транскрипции и анализ биопсий меланомы до лечения выявили обогащение TGFβ-ассоциированных путей и биологических процессов в опухолях, которые не отвебчают на СВТ с помощью антитела к PD-1. Совсем недавно аналогичный анализ опухолей у пациентов с метастатическим уротелиальным раком показал, что отсутствие ответа на блокаду PD-L1 атезолизумабом было ассоциировано с транскрипционными сигнатурами передачи сигналов TGFβ, особенно в опухолях, где CD8+ Т-клетки, по-видимому, не допущены к проникновению в опухоль. Критическая роль передачи сигналов TGFβ в опосредовании иммунного исключения, приводящей к устойчивости к антителу к PD-(L)1, была подтверждена на сингенной мышиной модели

рака груди EMT-6. В то время как опухоли EMT-6 слабо реагируют на лечение антителом к PD-L1, сочетание этого ингибитора контрольной точки с 1D11, антителом, которое блокирует активность всех изоформ TGFβ, привело к значительному увеличению частоты полных ответов по сравнению с лечением отдельными ингибиторами. Предполагается, что синергетическая противоопухолевая активность обусловлена изменением фенотипа ассоциированных с раком фибробластов (CAF) и нарушением фенотипа иммуной эксклюзии, что приводит к инфильтрации активированных CD8+ Т-клеток в опухоли. Сходные результаты были получены на мышиной модели рака толстой и прямой кишки и метастазов с использованием комбинации антитела к PD-L1 с галунизертибом, низкомолекулярным ингибитором киназы ALK5 рецептора TGFβ типа I. В совокупности эти результаты позволяют предположить, что ингибирование пути TGFβ в опухолях, устойчивых к СВТ, может быть многообещающим подходом для улучшения или увеличения количества клинических ответов на СВТ. В то время как недавние исследования выявили связь между активацией пути TGFβ и первичной устойчивостью к СВТ, передача сигналов TGFβ уже давно связана с особенностями патогенеза рака. Как мощный иммуносупрессивный фактор, TGFβ предотвращает противоопухолевую активность Т-клеток и стимулирует иммуносупрессивные макрофаги. Злокачественные клетки часто становятся устойчивыми к передаче сигналов TGFβ как механизм уклонения от его эффектов на рост и подавляющих опухоль эффектов. TGFβ активирует CAF, индуцируя продукцию внеклеточного матрикса и способствуя прогрессированию опухоли. Наконец, TGFβ индуцирует EMT, таким образом поддерживая тканевую инвазию и метастазы в опухоли.

[203] У млекопитающих есть разные гены, которые кодируют и экспрессируют три фактора роста TGFβ, TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3, все из которых передают сигнал через один и тот же гетеромерный рецепторный комплекс TGFβ. Несмотря на общий путь передачи сигналов, каждая изоформа TGFβ, по-видимому, выполняет различные биологические функции, о чем свидетельствуют неперекрывающиеся фенотипы мышей с нокаутом TGFβ. Все три изоформы TGFβ экспрессируются как неактивные комплексы продомен-фактор роста, в которых продомен TGFβ, также называемый ассоциированным с латентностью пептидом (LAP), обволакивает его фактор роста и удерживает его в латентном, несигнальном состоянии. Кроме того, латентный TGFβ коэкспрессируется с латентными TGFβ-связывающими белками и образует большие латентные комплексы (LLC) за счет дисульфидной связи. Ассоциация латентного TGFβ с латентным TGFβ-связывающим белком-1 (LTBP1) или LTBP3 делает возможным связывание с внеклеточным матриксом, тогда как ассоциация с трансмембранными белками GARP или LRRC33 делает возможной

выработку на поверхности Treg или макрофагов соответственно. In vivo латентный TGFβ1 и латентный TGFβ3 активируются подмножеством интегринов αV, которые связывают консенсусную последовательность RGD на LAP, запуская конформационные изменения для высвобождения фактора роста. Механизм активации латентного TGFβ2 менее ясен, поскольку в нем отсутствует консенсусный мотив RGD. Высвобождение TGFβ1 протеолитическим расщеплением LAP также рассматривается как механизм активации, но его биологическая значимость менее ясна.

[204] Хотя патогенная роль активации TGFβ очевидна при нескольких болезненных состояниях, также очевидно, что терапевтическое нацеливание на путь TGFβ было проблематичным из-за плейотропных эффектов, которые возникают в результате широкого и устойчивого ингибирования пути. Например, ряд исследований показал, что опосредованное малыми молекулами ингибирование киназы рецептора TGFβ типа I ALK5 (TGFBR1) или блокада всех трех тесно связанных факторов роста TGFβ с помощью высокоаффинного антитела приводило к тяжелым сердечным вальвулопатиям у мышей, крыс и собак. Эти неселективные в отношении TGFβ подходы, которые блокируют всю передачу сигналов TGFβ, поэтому имеют очень узкое терапевтическое окно, которое оказалось препятствием для лечения ряда связанных с заболеванием процессов с очень высокими неудовлетворенными медицинскими потребностями. На сегодняшний день не одобрена терапия, нацеленная на TGFβ, и результаты клинических испытаний с такими видами лечения в значительной степени разочаровывают, вероятно, из-за использования схем введения доз, которые оказались неэффективными, которые требовались для учета проблем безопасности.

[205] Проблемы безопасности, связанные с широким ингибированием TGFβ, вместе с неопровержимыми доказательствами критической роли этого пути в процессах множественных заболеваний, предполагают лучшее понимание конкретных ролей, которые играют один или несколько представителей семейства TGFβ в патологии заболеваний, может открыть путь к терапевтическому вмешательству. Что касается TGFβ и ответов на CBT, здесь авторы настоящего изобретения наблюдают преобладающую экспрессию TGFβ1 во многих опухолях человека, предполагая, что этот представитель семейства может быть ключевым фактором вклада этого пути в первичную устойчивость.

[206] Как упоминалось выше, все больше данных свидетельствует о том, что TGFβ может быть основным фактором в создании и/или поддержании иммуносупрессии в пораженных тканях, в том числе в окружении опухоли с иммунным исключением. Следовательно, ингибирование TGFβ может разблокировать иммуносупрессию и позволить эффекторным Т-клеткам (особенно цитотоксическим CD8+ Т-клеткам) получить доступ и убить раковые

клетки-мишени. В дополнение к инфильтрации опухоли ингибирование TGFβ может также способствовать размножению CD8+ Т-клеток. Такое размножение может происходить в лимфатических узлах и/или опухоли (внутриопухолево). Хотя точный механизм, лежащий в основе этого процесса, еще не выяснен, предполагается, что иммуносупрессия по меньшей мере частично опосредована активацией TGFβ1, ассоциированной с иммунными клетками, с участием регуляторных Т-клеток и активированных макрофагов. Сообщалось, что TGFβ напрямую стимулирует экспрессию Foxp3 в CD4+ Т-клетках, тем самым превращая их в регуляторный (иммуносупрессивный) фенотип (т.е. Treg). Более того, Treg подавляют пролиферацию эффекторных Т-клеток (см., например, фиг. 26B), тем самым снижая иммунные ответы. Показано, что этот процесс является TGFβ1-зависимым и, вероятно, в него вовлечена GARP-ассоциированная передача сигналов TGFβ1. Наблюдения как на людях, так и на моделях с использованием животных показали, что увеличение Treg в TME связано с плохим прогнозом при нескольких типах рака. Кроме того, заявитель настоящего изобретения ранее показал, что M2-поляризованные макрофаги, подвергнутые воздействию факторов опухолевого происхождения, таких как M-CSF, резко повышают экспрессию на клеточной поверхности LRRC33, который является презентирующей молекулой для TGFβ1 (см., например, PCT/US2018/031759). Считается, что эти так называемые ассоциированные с опухолью макрофаги (или TAM) вносят вклад в наблюдаемую TGFβ1-зависимую иммуносупрессию в TME и способствуют росту опухоли.

[207] Ряд солидных опухолей характеризуется наличием стромы опухоли, обогащенной миофибробластами или миофибробластоподобными клетками. Эти клетки производят коллагеновый матрикс, который окружает или покрывает опухоль (например, десмоплазия), что по меньшей мере частично может быть вызвано избыточно активной передачей сигналов TGFβ1. Предполагается, что активация TGFβ1 опосредована через ECM-ассоциированные презентирующие молекулы, например, LTBP1 и LTBP3, в строме опухоли.

[208] Заявитель настоящего изобретения ранее раскрыл антитела, способные ингибировать активацию TGFβ1 во многих из этих биологических контекстов, которые показали многообещающие эффекты как in vitro, так и in vivo (см., например, PCT/US2018/012601). Однако оставалась проблема: i) разработать улучшенное антитело, которое демонстрирует меньшее смещение в аффинностях по отношению к различным антигенным комплексам, чтобы гарантировать единообразные ингибирующие эффекты в различных биологических контекстах или нишах, в которых находится ассоциированный с заболеванием TGFβ1, и/или ii) разработать такое антитело, которое обеспечивает даже большую эффективность, чем ранее описанный аналог.

[209] Для работы, представленной в настоящем документе, предполагалось, что улучшенные антитела должны воплощать все или большинство из следующих характеристик: 1) должна поддерживаться селективность в отношении TGFβ1 для минимизации нежелательной токсичности, связанной с неселективным ингибированием («*селективность в отношении изоформ*») (см., например, PCT/US2017/021972); 2) должны проявлять широкую связывающую активность в различных биологических контекстах или в категориях, ассоциированных как с матриксом, так и с клетками («*контекстно-независимые*»); 3) должны достигать более равномерных или несмещенных аффинностей в ряду множественных комплексов антигенов («*однородность*»); 4) должны демонстрировать сильную связывающую активность в отношении каждого из антигенных комплексов («*высокоаффинные*»); и, 5) должны обладать устойчивыми ингибирующими активностями для каждого контекста («*эффективность*»). Кроме того, предпочтительным механизмом действия является ингибирование стадии активации, чтобы ингибитор мог нацеливаться на связанный с тканью латентный комплекс TGFβ1, чтобы упреждающе предотвратить нижележащие события активации для достижения стойких эффектов, а не непосредственно нацеливаться на растворимые/свободные факторы роста («*продолжительность действия*»). Как более подробно раскрыто в настоящем документе, новые улучшенные ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению являются высокоэффективными и высокоселективными ингибиторами латентной активации TGFβ1. Представленные в настоящем документе данные демонстрируют, среди прочего, что этот механизм специфического в отношении изоформ ингибирования достаточен для преодоления первичной устойчивости к антителам к PD-1 в моделях сингенных мышей, которые точно воспроизводят некоторые особенности первичной устойчивости к CBT, обнаруженной при формах рака человека. Вместе с улучшенным доклиническим профилем безопасности таких антител по сравнению с «неселективными» ингибиторами TGFβ, эти данные об эффективности обеспечивают обоснование для изучения терапевтического использования селективного ингибирования TGFβ1 для расширения и усиления клинических ответов на блокаду контрольных точек в иммунотерапии рака, а также для лечения ряда дополнительных показаний, связанных с TGFβ1.

Новые, высокоаффинные, селективные в отношении изоформы антитела к proTGFβ1

Общие признаки

[210] В настоящем документе описаны высокоаффинные улучшенные ингибиторы TGFβ1, отличающиеся тем, что по сравнению с TGFβ1-селективными ингибиторами,

раскрытыми ранее, эти антитела обладают усиленными связывающими свойствами, повышенной ингибирующей активностью и поддерживают требуемые профили безопасности и селективность в отношении изоформы. Эти TGFβ1-селективные ингибиторы согласно настоящему раскрытию представляют собой моноклональные антитела (например, иммуноглобулины, сконструированные иммуноглобулиноподобные молекулы, их антигенсвязывающие фрагменты или части), которые специфически связываются по меньшей мере с частью продомена (иногда называемого «LAP») латентного комплекса proTGFβ1 и обладают селективной в отношении изоформы ингибирующей активностью в отношении TGFβ1 (см. «Основные свойства» в таблице 1).

[211] Улучшенные связывающие свойства антител в соответствии с настоящим раскрытием включают в себя повышенные аффинности, измеренные в равновесии. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело характеризуется KD ≤ 1 нМ по меньшей мере для одного из комплексов LLC человека (hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и/или hLRRC33-proTGFβ1), как измерено с помощью MSD-SET. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело характеризуется KD ≤ 1 нМ для двух комплексов LLC человека, выбранных из: hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, как измерено с помощью MSD-SET. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело характеризуется KD ≤ 1 нМ для трех комплексов LLC человека, выбранных из: hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, как измерено с помощью MSD-SET. Согласно предпочтительным вариантам осуществления такое антитело характеризуется KD ≤ 1 нМ для каждого из комплексов LLC человека: hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, как измерено с помощью MSD-SET. Согласно настоящему раскрытию высокоаффинные антитела могут характеризоваться значением KD для конкретного антигена (например, антигенного комплекса), которое составляет 1 нМ или меньше, например, ≤ 1 нМ, ≤ 0,5 нМ, ≤ 400 пМ, ≤ 300 пМ, ≤ 200 пМ и ≤ 100 пМ, в состоянии равновесия.

[212] Настоящее изобретение также включает в себя антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые способны специфически связывать каждый из комплексов LLC человека (hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1) с KD ≤ 10 нМ (например, ≤ 10 нМ, ≤ 9 нМ, ≤ 8 нМ, ≤ 7 нМ, ≤ 6 нМ, ≤ 5 нМ, ≤ 4 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ, ≤ 0,5 нМ и ≤ 0,1 нМ) при измерении в состоянии равновесия, например MSD-SET. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает каждый из вышеупомянутых комплексов LLC с KD ≤ 5 нМ, как измерено методом на основе титрования равновесного раствора. Согласно некоторым вариантам

осуществления антитело связывает каждый из вышеупомянутых LLC-комплексов с KD ≤ 1 нМ, как измерено методом на основе титрования равновесного раствора.

[213] Для терапевтического применения для лечения показаний, связанных с TGFβ1, характеризующихся как дисрегуляцией внеклеточного матрикса, так и иммунным компонентом, благоприятным будет выбрать антитело с высокой аффинностью (например, KD ≤ 1 нМ) по меньшей мере для одного из ECM-ассоциированных комплексов proTGFβ1 (hLTBP1-proTGFβ1 и/или hLTBP3-proTGFβ1) и дополнительно по меньшей мере одного из ассоциированных с клеткой комплексов proTGFβ1 (hGARP-proTGFβ1 и/или hLRRC33-proTGFβ1), чтобы проявлять ингибирующие эффекты на оба контекста (например, на ECM и обращенные к иммунным клеткам). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело характеризуется высокой аффинностью (например, KD ≤ 1 нМ) как к hLTBP1-proTGFβ1, так и к hLTBP3-proTGFβ1, а также по меньшей мере к одному из ассоциированных с клеткой комплексов proTGFβ1 (hGARP-proTGFβ1 или hLRRC33-proTGFβ1). Согласно другим вариантам осуществления антитело характеризуется высокой аффинностью (например, KD ≤ 1 нМ) к каждому из вышеупомянутых комплексов (hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1). Согласно предпочтительным вариантам осуществления такое антитело характеризуется KD ≤ 200 пМ для каждого из комплексов человека, например, ≤ 100 пМ, как измерено методом на основе титрования равновесного раствора, таким как MSD-SET.

[214] Варианты осуществления настоящего раскрытия включают в себя высокоаффинные контекстно-независимые антитела. Такие антитела способны связываться с эквивалентными аффинностями с четырьмя известными комплексами презентирующая молекула-proTGFβ1, а именно, LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1. Эквивалентные аффинности могут означать, что либо самая низкая аффинность (наивысшее численное значение KD), которую демонстрирует антитело среди четырех антигенных комплексов, не более чем в пять раз меньше, чем среднее значение, рассчитанное из оставшихся трех аффинностей; либо самая высокая аффинность (наименьшее числовое значение KD), которую демонстрирует антитело среди четырех антигенных комплексов, не более чем в пять раз превышает среднее значение, рассчитанное из остальных трех аффинностей. Согласно некоторым вариантам осуществления, когда соотношение средних значений KD двух ассоциированных с ECM комплексов и средних значений KD двух ассоциированных с клеткой комплексов является не более трехкратным, можно сказать, что такие антитела характеризуются эквивалентными аффинностями.

[215] Антитела с эквивалентными аффинностями могут достигать более однородных (например, несмещенных) ингибирующих эффектов, независимо от

конкретной презентирующей молекулы, ассоциированной с комплексом proTGFβ1 (следовательно, «контекстно-независимо»). Согласно особенно предпочтительным вариантам осуществления антитело представляет собой высокоаффинное, контекстно-независимое антитело в том смысле, что аффинность к каждому из четырех LLC человека составляет 1 нМ или меньше (например, 200 пМ или меньше), как измерено методом титрования равновесного раствора, и антитело характеризуются эквивалентными аффинностями ко всем четырем LLC человека, описанным выше. Например, смещение, наблюдаемое в средних аффинностях между ассоциированными с матриксом комплексами и ассоциированными с клетками комплексами, не превышает трехкратного.

[216] Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело специфически связывает каждый из вышеупомянутых комплексов (hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1) с KD ≤ 10 нМ (например, ≤ 10 нМ, ≤ 9 нМ, ≤ 8 нМ, ≤ 7 нМ, ≤ 6 нМ, ≤ 5 нМ, ≤ 4 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ, ≤ 0,5 нМ и ≤ 0,1 нМ), как измерено с помощью метода на основе титрования равновесного раствора, такого как MSD-SET.

[217] Любое из описываемых в настоящем документе ингибирующих антител может связывать каждый из вышеупомянутых больших латентных комплексов (hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1) в области(ях) связывания, которая(ые) включает(ют) в себя по меньшей мере часть лассо латентности в продомене комплекса proTGFβ1. Такие области связывания могут дополнительно включать в себя по меньшей мере часть домена фактора роста. Согласно особенно предпочтительным вариантам осуществления такие антитела связываются с каждым из LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1 со значением $K_D \leq 200$ пМ (например, ≤ 150 пМ и ≤ 100 пМ) в области(ях) связывания внутри комплекса LLC, включая в себя по меньшей мере часть лассо латентности и по меньшей мере часть домена фактора роста.

[218] Согласно некоторым вариантам осуществления высокоаффинное, контекстно-независимое антитело, способное селективно ингибировать TGFβ1, может ингибировать TGFβ1, активированный независимо от режима активации. Например, известно, что некоторые интегрины напрямую связывают мотивы RGD в продомене LLC и механически «открывают» похожую на клетку структуру продомена, тем самым вызывая высвобождение фактора роста TGFβ1 из латентного комплекса. Отдельно было показано, что определенные протеазы, присутствующие во внеклеточном окружении, активируют TGFβ1 интегрин-независимым образом. Антитело, которое непосредственно нацелено на мотив RGD, тем самым препятствуя связыванию интегрина, может не ингибировать

протеазозависимую активацию TGFβ1. И наоборот, антитело, которое напрямую нацелено на один или несколько сайтов узнавания или расщепления протеазой, может не ингибировать интегрин-зависимую активацию TGFβ1. Напротив, согласно предпочтительным вариантам осуществления настоящего изобретения высокоаффинное, контекстно-независимое антитело способно ингибировать интегрин-зависимую активацию TGFβ1 и протеазозависимую активацию TGFβ1.

[219] Хотя высокоаффинное связывание с белками-мишенями человека является важным признаком терапевтических средств - антител, способность также перекрестно реагировать с дополнительными видовыми аналогами является предпочтительной. В частности, учитывая, что большинство доклинических фармакологических моделей создано на грызунах, перекрестная видовая реактивность с белками мыши/крысы обеспечивает удобные инструменты в качестве суррогатных антител для доклинических исследований. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления высокоаффинные антитела согласно настоящему изобретению преимущественно перекрестно реагируют с другими аналогами млекопитающих, такими как мыши, крысы и/или не относящиеся к человеку приматы.

[220] Среди новых антител, охватываемых настоящим раскрытием, особенно предпочтительные классы антител и их характеристики классифицированы и обсуждаются ниже.

Предпочтительные признаки

[221] Согласно некоторым вариантам осуществления в дополнение к признакам основных свойств, предпочтительные антитела, раскрытые в настоящем документе, дополнительно соответствуют критериям антител одной или нескольких категорий 1-5, как указано в таблице 1 настоящего документа.

[222] Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительные необходимые критерии антител согласно настоящему изобретению определяются их связывающими свойствами, например, аффинностью антитела к антигену. «Антиген» в этом контексте включает в себя по меньшей мере четыре белковых комплекса, а именно, большие латентные комплексы (LLC) человека TGFβ1, называемые комплексами hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1. Согласно настоящему изобретению по настоящему раскрытию антитела способны связываться с каждым из этих комплексов с определенными аффинностями, как правило, измеряемой как значения K_D. Антитела категории 1 и категории 2 подпадают под эти варианты осуществления. В целях определения критериев, основанных на свойствах связывания

(например, категории 1 и 2), аффинность антител определяется в состоянии равновесия, а не с помощью кинетического анализа (такого как, BLI).

[223] Дополнительно или альтернативно, дополнительные необходимые критерии антител согласно настоящему изобретению определяются их аминокислотными последовательностями. Антитела категории 3 и категории 4 определяются последовательностями CDR антител, тогда как антитела категории 5 определяются последовательностями их вариабельных доменов тяжелой цепи и легкой цепи.

Таблица 1. Предпочтительные признаки новых высокоаффинных TGFβ1-селективных ингибиторов согласно настоящему изобретению

Категория	**Критерии антител**	**Иллюстративные антитела**
(Все)	Основные свойства: • Селективно ингибирует передачу сигналов TGFβ1 по сравнению с передачей сигналов TGFβ2 и TGFβ3 • Специфически связывает каждый из комплексов: LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1 (человека и/или мыши) • В связывание вовлечена по меньшей мере часть продомена proTGFβ1 • Улучшенные профили безопасности/токсикологии по сравнению с неселективными ингибиторами TGFβ.	• Настоящее раскрытие • WO 2018/129329 (Ab3) • WO 2017/156500
Дополнительные необходимые критерии, определяемые профилями связывания (как определено титрованием при равновесии в растворе)		
1	Антитело соответствует основным свойствам; и, связывает каждый из следующих комплексов человека с KD, составляющей ≤ 200 пМ: • hLTBP1-proTGFβ1; • hLTBP3-proTGFβ1; • hGARP-proTGFβ1; и • hLRRC33-proTGFβ1	• Ab6 • Ab22 • Ab24 • Ab26 • Ab29 • Ab30 • Ab31 • Ab32 • Ab33
2	Антитело соответствует основным свойствам; и	По меньшей мере Ab5 и Ab6

Категория	Критерии антител	Иллюстративные антитела
	связывает каждый из следующих комплексов человека с KD, составляющей ≤ 1 нМ: • hLTBP1-proTGFβ1; • hLTBP3-proTGFβ1; • hGARP-proTGFβ1; и, • hLRRC33-proTGFβ1; и, область связывания содержит по меньшей мере часть лассо латентности, как определено HD-X или кристаллографией	
Дополнительные необходимые критерии, определяемые последовательностями антител		
3	Антитело соответствует основным свойствам; и, **H-CDR1** характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной FTF(X_1)(X_2)(X_3)(X_4)M(X_5), где необязательно: X_1 = S, G или A; X_2 = S или F; X_3 = F или Y; X_4 = S или A; и/или X_5 = D, N или Y (SEQ ID NO: 143); **H-CDR2** характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной YI(X_1)(X_2)(X_3)A(X_4)TIYYA(X_5)SVKG, где необязательно: X_1 = S или H; X_2 = P или S; X_3 = S или D; X_4 = D или S; и/или X_5 = D или G (SEQ ID NO: 144); **H-CDR3** характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной (X_1)R(X_2)(X_3)(X_4)D(X_5)GDML(X_6)P, где необязательно: X_1 = A или V; X_2 = G или A; X_3 = V или T; X_4 = L или W; X_5 = Y или M; и/или X_6 = M или D (SEQ ID NO: 145); **L-CDR1** характеризуется аминокислотной последовательностью QASQDITNYLN, с необязательно заменами 1 или 2 аминокислот (SEQ ID NO: 105);	• Ab5 • Ab6 • Ab21 • Ab22 • Ab23 • Ab24 • Ab25 • Ab26 • Ab27 • Ab28 • Ab29 • Ab30 • Ab31 • Ab32 • Ab34

Категория	Критерии антител	Иллюстративные антитела
	L-CDR2 характеризуется аминокислотной последовательностью DASNLET, с необязательно заменами 1 или 2 аминокислот (SEQ ID NO: 106); и, **L-CDR3** характеризуется аминокислотной последовательностью QQADNHPPWT, с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 12).	
4	Антитело соответствует основным свойствам; и, **H-CDR1** характеризуется аминокислотной последовательностью FTFSSFSMD, с необязательно вплоть до 4 аминокислотными заменами или вплоть до 2 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 107); или, FTFSSFSMN, с необязательно вплоть до 4 аминокислотными заменами или вплоть до 2 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 114); **H-CDR2** характеризуется аминокислотной последовательностью YISPDASTIYYADSVKG, с необязательно вплоть до 4 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 111); **H-CDR3** характеризуется аминокислотной последовательностью ARGVLDYGDMLDP, с необязательно вплоть до 3 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 110); **L-CDR1** характеризуется аминокислотной последовательностью QASQDITNYLN, с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 105); **L-CDR2** характеризуется аминокислотной последовательностью DASNLET, с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 106); и,	• Ab4 • Ab5 • Ab6 • Ab21 • Ab22 • Ab23 • Ab24 • Ab25 • Ab26 • Ab27 • Ab28 • Ab29 • Ab30 • Ab31 • Ab32 • Ab33 • Ab34

Категория	Критерии антител	Иллюстративные антитела
	L-CDR3 характеризуется аминокислотной последовательностью QQADNHPPWT, с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 12).	
5	Антитело соответствует основным свойствам; и, содержит: вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по отношению к EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPSADTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLMPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 13) вариабельный домен легкой цепи (V_L), характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по отношению к DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)	• Ab4 • Ab5 • Ab6 • Ab21 • Ab22 • Ab23 • Ab24 • Ab25 • Ab26 • Ab27 • Ab28 • Ab29 • Ab30 • Ab31 • Ab32 • Ab33 • Ab34

[224] Неограничивающие варианты осуществления каждой из категорий представлены ниже.

Антитела категории 1

[225] Раскрытые в настоящем документе антитела представляют собой высокоаффинные, селективные в отношении изоформы антитела, способные специфически нацеленно воздествовать на человеческие большие латентные комплексы TGFβ1.

[226] Согласно оному аспекту настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связывают каждый из следующих LLC человека с KD, составляющей ≤ 200 пМ: комплексы hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, причем аффинность

измеряют в состоянии равновесия с использованием подходящих анализов, таких как анализ на основе титрования равновесного раствора.

[227] Такое антитело или фрагмент может связывать каждый из комплексов hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1 с KD, составляющей ≤ 150 пМ, как измерено с помощью титрования равновесного раствора. Более предпочтительно, такое антитело или фрагмент может связывать каждый из комплексов hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1 с KD, составляющей ≤ 100 пМ, как измерено с помощью титрования равновесного раствора. Можно использовать любые подходящие анализы аффинности in vitro, которые способны определять значения KD антитела в состоянии равновесия, включая в себя, например, MSD-SET, который более подробно описан в другом месте в настоящем документе. Неограничивающие примеры раскрытых в настоящем документе антител, которые удовлетворяют критериям антител для предпочтительных антител категории 1, включают в себя: Ab6, Ab22, Ab24, Ab26, Ab29, Ab30, Ab31, Ab32 и Ab33.

[228] Антитело может также связываться с высокой специфичностью и высокими аффинностями с соответствующими LLC дополнительных видов. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело проявляет видовую перекрестную реактивность с мышиными аналогами.

Антитела категории 2

[229] Раскрытые в настоящем документе антитела представляют собой высокоаффинные, селективные в отношении изоформы антитела, способные специфически нацеленно воздействовать на человеческие большие латентные комплексы TGFβ1.

[230] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связывают каждый из следующих LLC человека с KD, составляющей ≤ 1 нМ: комплексы hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, причем аффинность измеряют в состоянии равновесия с использованием подходящих анализов, таких как анализ на основе титрования равновесного раствора, и где антитело или фрагмент связывает LLC человека в области связывания, которая содержит по меньшей мере часть лассо латентности. Лассо латентности представляет собой белковый домен, который является частью так называемой «Straight Jacket» продомена. В своей нативной форме лассо латентности полипептида proTGFβ1 человека характеризуется аминокислотной последовательностью LASPPSQGEVPPGPL (SEQ ID NO: 153). Для определения того, связывает ли антитело LLC TGFβ1 человека в области, которая включает в себя по меньшей

мере часть лассо латентности, можно использовать любые подходящие методы. Например, можно проводить конкурентные анализы, в которых используются соответствующие полипептиды. Согласно некоторым вариантам осуществления области связывания можно определить с помощью HD-X или рентгеновской кристаллографии.

[231] Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело или фрагмент может связывать каждый из комплексов hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1 с KD, составляющей ≤ 500 пМ (необязательно ≤ 400 пМ, ≤ 300 пМ, ≤ 200 пМ или ≤ 100 пМ), как измерено с помощью титрования равновесного раствора, где антитело или фрагмент связывает LLC человека в области связывания, которая содержит по меньшей мере часть лассо латентности. Неограничивающие примеры антител, раскрытых в настоящем документе, которые удовлетворяют критериям антител для предпочтительных антител категории 2, включают в себя: Ab5 и Ab6.

[232] Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело может дополнительно связывать LLC человека в дополнительной(ых) области(ях) связывания, которая(ые) содержит(ат) по меньшей мере часть домена фактора роста в комплексе proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное связывание происходит только в контексте комплекса латентности, так что антитело не связывается специфически со свободным фактором роста, который не связан с комплексом продомена. Дополнительная(ые) область(и) связывания в пределах домена фактора роста LLC могут включать в себя по меньшей мере часть белковых доменов, называемых «Finger-1» и/или «Finger-2». Следовательно, такое антитело может связывать комбинаторный эпитоп, который содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток лассо латентности и по меньшей мере один аминокислотный остаток домена фактора роста.

[233] Антитело может также связываться с высокой специфичностью и высокими аффинностями с соответствующими LLC дополнительных видов. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело проявляет видовую перекрестную реактивность с мышиными аналогами.

Антитела категории 3

[234] Раскрытые в настоящем документе антитела представляют собой высокоаффинные, селективные в отношении изоформы антитела, способные специфически нацеленно воздействовать на человеческие большие латентные комплексы TGFβ1.

[235] Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, где CDR-H1 характеризуется аминокислотной

последовательностью, представленной FTF(X_1)(X_2)(X_3)(X_4)M(X_5) (SEQ ID NO: 143). Согласно некоторым вариантам осуществления X_1 может представлять собой S, G или A; X_2 может представлять собой S или F; X_3 может представлять собой F или Y; X_4 может представлять собой S или A; и/или X_5 может представлять собой D, N или Y, в любой комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления, где H-CDR1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, положение X1 может быть замещено на S; положение X2 может быть замещено на S; положение X3 может быть замещено на F; положение X4 может быть замещено на S; и/или положение X5 может быть замещено на D.

[236] CDR-H2 антитела характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной YI(X_1)(X_2)(X_3)A(X_4)TIYYA(X_5)SVKG (SEQ ID NO: 144). Согласно некоторым вариантам осуществления X_1 может представлять собой S или H; X_2 может представлять собой P или S; X_3 может представлять собой S или D; X_4 может представлять собой D или S; и/или X_5 может представлять собой D или G, в любой комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления, где H-CDR2 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, положение X1 может быть замещено на S; положение X2 может быть замещено на a P; положение X3 может быть замещено на D; положение X4 может быть замещено на S; и/или положение X5 может быть замещено на D.

[237] CDR-H3 антитела характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной (X_1)R(X_2)(X_3)(X_4)D(X_5)GDML(X_6)P (SEQ ID NO: 145). Согласно некоторым вариантам осуществления X_1 может представлять собой A или V; X_2 может представлять собой G или A; X_3 может представлять собой V или T; X_4 может представлять собой L или W; X_5 может представлять собой Y или M; и/или X_6 может представлять собой M или D, в любой комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления, где H-CDR3 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, положение X1 может быть замещено на A; положение X2 может быть замещено на a G; положение X3 может быть замещено на a V; положение X4 может быть замещено на L; положение X5 может быть замещено на a Y; и/или положение X6 может быть замещено на D.

[238] CDR-L1 характеризуется аминокислотной последовательностью QASQDITNYLN (SEQ ID NO: 105), с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами.

[239] CDR-L2 характеризуется аминокислотной последовательностью DASNLET (SEQ ID NO: 106), с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами.

[240] CDR-L3 характеризуется аминокислотной последовательностью QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12), с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами.

[241] Неограничивающие примеры раскрытых в настоящем документе антител, которые удовлетворяют критериям антител для предпочтительных антител категории 3

включают в себя: Ab5, Ab6, Ab21, Ab22, Ab23, Ab24, Ab25, Ab26, Ab27, Ab28, Ab29, Ab30, Ab31, Ab32 и Ab34.

[242] В таблице 2 ниже обобщенно представлены консенсусные последовательности CDR антител категории 3. Согласно некоторым вариантам осуществления каждая из последовательностей CDR может необязательно содержать одну или несколько аминокислотных замен, указанных ниже.

Таблица 2. Консенсусные последовательности CDR тяжелой и легкой цепей и предпочтительные аминокислотные замены

	Консенсусные последовательности CDR
CDRH1	FTF(X_1)(X_2)(X_3)(X_4)M(X_5), где необязательно: X_1 = S, G или A; X_2 = S или F; X_3 = F или Y; X_4 = S или A; и/или X_5 = D, N или Y (SEQ ID NO: 143)
CDRH2	YI(X_1)(X_2)(X_3)A(X_4)TIYYA(X_5)SVKG, где необязательно: X_1 = S или H; X_2 = P или S; X_3 = S или D; X_4 = D или S; и/или X_5 = D или G (SEQ ID NO: 144)
CDRH3	(X_1)R(X_2)(X_3)(X_4)D(X_5)GDML(X_6)P, где необязательно: X_1 = A или V; X_2 = G или A; X_3 = V или T; X_4 = L или W; X_5 = Y или M; и/или X_6 = M или D (SEQ ID NO: 145)
CDRL1	QASQDITNYLN, с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 105)
CDRL2	DASNLET, с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 106)
CDRL3	QQADNHPPWT, с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 12)

[243] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело категории 3или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает каждый из следующих LLC человека с KD, составляющей ≤ 1 нМ: комплексы hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, причем аффинность измеряют в состоянии

равновесия с использованием подходящих анализов, таких как анализ на основе титрования равновесного раствора.

[244] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывает LLC человека в области связывания, которая содержит по меньшей мере часть лассо латентности. Лассо латентности представляет собой белковый домен, который является частью так называемой «Straight Jacket» продомена. В своей нативной форме лассо латентности полипептида proTGFβ1 человека характеризуется аминокислотной последовательностью LASPPSQGEVPPGPL (SEQ ID NO: 153). Для определения того, связывает ли антитело LLC TGFβ1 человека в области, которая включает в себя по меньшей мере часть лассо латентности, можно использовать любые подходящие методы. Например, можно проводить конкурентные анализы, в которых используются соответствующие полипептиды. Согласно некоторым вариантам осуществления области связывания можно определить с помощью HD-X или рентгеновской кристаллографии.

[245] Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело или фрагмент может связывать каждый из комплексов hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1 с KD, составляющей ≤ 500 пМ (необязательно ≤ 400 пМ, ≤ 300 пМ, ≤ 200 пМ или ≤ 100 пМ), как измерено с помощью титрования равновесного раствора, где антитело или фрагмент связывает LLC человека в области связывания, которая содержит по меньшей мере часть лассо латентности.

[246] Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело может дополнительно связывать LLC человека в дополнительной(ых) области(ях) связывания, которая(ые) содержит(ат) по меньшей мере часть домена фактора роста в комплексе proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное связывание происходит только в контексте комплекса латентности, так что антитело не связывается специфически со свободным фактором роста, который не связан с комплексом продомена. Дополнительная(ые) область(и) связывания в пределах домена фактора роста LLC могут включать в себя по меньшей мере часть белковых доменов, называемых «Finger-1» и/или «Finger-2». Следовательно, такое антитело может связывать комбинаторный эпитоп, который содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток лассо латентности и по меньшей мере один аминокислотный остаток домена фактора роста.

[247] Антитело может также связываться с высокой специфичностью и высокими аффинностями с соответствующими LLC дополнительных видов. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело проявляет видовую перекрестную реактивность с мышиными аналогами.

[248] В настоящем документе предусмотрены перекрестно-блокирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его фрагмент перекрестно блокирует или перекрестно конкурирует с одним из антител категории 3, где антитело характеризуется KD, составляющей ≤ 1 нМ по меньшей мере для одного из комплексов LLC человека (hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и/или hLRRC33-proTGFβ1), как измерено с помощью MSD-SET. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело характеризуется KD, составляющей ≤ 1 нМ для двух из комплексов LLC человека, выбранных из: hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, как измерено с помощью MSD-SET. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело характеризуется KD, составляющей ≤ 1 нМ для трех из комплексов LLC человека, выбранных из: hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, как измерено с помощью MSD-SET. Согласно предпочтительным вариантам осуществления, такое антитело характеризуется KD, составляющей ≤ 1 нМ для каждого из комплексов LLC человека: hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, как измерено с помощью MSD-SET. Согласно настоящему раскрытию, высокоаффинные антитела могут характеризоваться значением KD для конкретного антигена (например, антигенного комплекса), которое составляет 1 нМ или меньше, например, ≤ 1 нМ, ≤ 0,5 нМ, ≤ 400 пМ, ≤ 300 пМ, ≤ 200 пМ и ≤ 100 пМ, в состоянии равновесия.

Антитела категории 4

[249] Раскрытые в настоящем документе антитела представляют собой высокоаффинные, селективные в отношении изоформы антитела, способные специфически нацеленно воздействовать на человеческие большие латентные комплексы TGFβ1.

[250] Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, где: H-CDR1 содержит FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107) или FTFSSFSMN (SEQ ID NO: 114), где необязательно каждая может содержать вплоть до 4 аминокислотных замен (необязательно вплоть до 4, вплоть до 3, вплоть до 2 или 1 аминокислотной замены); H-CDR2 содержит YISPDASTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 111), где необязательно H-CDR2 может содержать вплоть до 4 аминокислотных замен (необязательно вплоть до 4, вплоть до 3, вплоть до 2 или 1 аминокислотной замены), H-CDR3 содержит ARGVLDYGDMLDP (SEQ ID NO: 110), где необязательно H-CDR3 может содержать вплоть до 3 аминокислотных замен (необязательно вплоть до 3, вплоть до 2 или

1 аминокислотной замены); L-CDR1 QASQDITNYLN (SEQ ID NO: 105), с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами; L-CDR2 содержит DASNLET (SEQ ID NO: 106), с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами; и L-CDR3 содержит QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12), с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами.

[251] Неограничивающие примеры раскрытых в настоящем документе антител, которые удовлетворяют критериям антител для предпочтительных антител категории 4 включают в себя: Ab4, Ab5, Ab6, Ab21, Ab22, Ab23, Ab24, Ab25, Ab26, Ab27, Ab28, Ab29, Ab30, Ab31, Ab32, Ab33 и Ab34.

[252] В таблице 3 ниже обобщенно представлены последовательности CDR антител категории 4. Согласно некоторым вариантам осуществления каждая из последовательностей CDR может необязательно содержать одну или несколько аминокислотных замен, указанных ниже.

Таблица 3. Последовательности CDR и варианты

	CDR и варианты
CDRH1	i) FTFSSFSMD, с необязательно вплоть до 4 аминокислотными заменами или вплоть до 2 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 107; или, ii) FTFSSFSMN, с необязательно вплоть до 4 аминокислотными заменами или вплоть до 2 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 114)
CDRH2	YISPDASTIYYADSVKG, с необязательно вплоть до 4 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 111)
CDRH3	ARGVLDYGDMLDP, с необязательно вплоть до 3 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 110)
CDRL1	QASQDITNYLN, с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 105)
CDRL2	DASNLET, с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 106)
CDRL3	QQADNHPPWT, с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами (SEQ ID NO: 12)

[253] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело категории 4 или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает каждый из следующих LLC человека с KD, составляющей ≤ 1 нМ: комплексы hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1,

hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, причем аффинность измеряют в состоянии равновесия с использованием подходящих анализов, таких как анализ на основе титрования равновесного раствора.

[254] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывает LLC человека в области связывания, которая содержит по меньшей мере часть лассо латентности. Лассо латентности представляет собой белковый домен, который является частью так называемой «Straight Jacket» продомена. В своей нативной форме лассо латентности полипептида proTGFβ1 человека характеризуется аминокислотной последовательностью LASPPSQGEVPPGPL (SEQ ID NO: 153). Для определения того, связывает ли антитело LLC TGFβ1 человека в области, которая включает в себя по меньшей мере часть лассо латентности, можно использовать любые подходящие методы. Например, можно проводить конкурентные анализы, в которых используются соответствующие полипептиды. Согласно некоторым вариантам осуществления области связывания можно определить с помощью HD-X или рентгеновской кристаллографии.

[255] Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело или фрагмент может связывать каждый из комплексов hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1 с KD, составляющей ≤ 500 пМ (необязательно ≤ 400 пМ, ≤ 300 пМ, ≤ 200 пМ или ≤ 100 пМ), как измерено с помощью титрования равновесного раствора, где антитело или фрагмент связывает LLC человека в области связывания, которая содержит по меньшей мере часть лассо латентности.

[256] Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело может дополнительно связывать LLC человека в дополнительной(ых) области(ях) связывания, которая(ые) содержит(ат) по меньшей мере часть домена фактора роста в комплексе proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное связывание происходит только в контексте комплекса латентности, так что антитело не связывается специфически со свободным фактором роста, который не ассоциирован с комплексом продомена. Дополнительная(ые) область(и) связывания в пределах домена фактора роста LLC могут включать в себя по меньшей мере часть белковых доменов, называемых «Finger-1» и/или «Finger-2». Следовательно, такое антитело может связывать комбинаторный эпитоп, который содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток лассо латентности и по меньшей мере один аминокислотный остаток домена фактора роста.

[257] Антитело может также связываться с высокой специфичностью и высокими аффинностями с соответствующими LLC дополнительных видов. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело проявляет видовую перекрестную реактивность с мышиными аналогами.

[258] В настоящем документе предусмотрены перекрестно-блокирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его фрагмент перекрестно блокирует или перекрестно конкурирует с одним из антител категории 4, где антитело характеризуется KD, составляющей ≤ 1 нМ по меньшей мере для одного из комплексов LLC человека (hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и/или hLRRC33-proTGFβ1), как измерено с помощью MSD-SET. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело характеризуется KD, составляющей ≤ 1 нМ для двух из комплексов LLC человека, выбранных из: hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, как измерено с помощью MSD-SET. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело характеризуется KD, составляющей ≤ 1 нМ для трех из комплексов LLC человека, выбранных из: hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, как измерено с помощью MSD-SET. Согласно предпочтительным вариантам осуществления, такое антитело характеризуется KD, составляющей ≤ 1 нМ для каждого из комплексов LLC человека: hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, как измерено с помощью MSD-SET. Согласно настоящему раскрытию, высокоаффинные антитела могут характеризоваться значением KD для конкретного антигена (например, антигенного комплекса), которое составляет 1 нМ или меньше, например, ≤ 1 нМ, ≤ 0,5 нМ, ≤ 400 пМ, ≤ 300 пМ, ≤ 200 пМ и ≤ 100 пМ, в состоянии равновесия.

Антитела категории 5

[259] Раскрытые в настоящем документе антитела представляют собой высокоаффинные, селективные в отношении изоформы антитела, способные специфически нацеленно воздействовать на человеческие большие латентные комплексы TGFβ1.

[260] Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые содержат вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по отношению к EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSFSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPSADTIY YADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGVLDYGDMLMPWGQGTL VTVSS (SEQ ID NO: 13); и вариабельный домен легкой цепи (V_L), характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по отношению к DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPS RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 15).

[261] Согласно некоторым вариантам осуществления вариабельный домен тяжелой цепи антителе является по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичным по отношению к последовательности VH, представленной в SEQ ID NO: 13.

[262] Согласно некоторым вариантам осуществления вариабельный домен тяжелой цепи антитела является по меньшей мере на 95% идентичным по отношению к указанной выше последовательности VH.

[263] Согласно некоторым вариантам осуществления вариабельный домен тяжелой цепи антитела является по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичным по отношению к последовательности VL, представленной в SEQ ID NO: 15.

[264] Согласно некоторым вариантам осуществления вариабельный домен легкой цепи антитела является по меньшей мере на 95% идентичным по отношению к указанной выше последовательности VL.

[265] Неограничивающие примеры раскрытых в настоящем документе антител, которые удовлетворяют критериям антител для предпочтительных антител категории 5 включают в себя: Ab4, Ab5, Ab6, Ab21, Ab22, Ab23, Ab24, Ab25, Ab26, Ab27, Ab28, Ab29, Ab30, Ab31, Ab32, Ab33 и Ab34.

[266] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело категории 5 или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает каждый из следующих LLC человека с KD, составляющей $\leq$ 1 нМ: комплексы hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, причем аффинность измеряют в состоянии равновесия с использованием подходящих анализов, таких как анализ на основе титрования равновесного раствора.

[267] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывает LLC человека в области связывания, которая содержит по меньшей мере часть лассо латентности. Лассо латентности представляет собой белковый домен, который является частью так называемой «Straight Jacket» продомена. В своей нативной форме лассо латентности полипептид proTGFβ1 характеризуется аминокислотной последовательностью LASPPSQGEVPPGPL (SEQ ID NO: 153). Для определения того, связывает ли антитело LLC TGFβ1 человека в области, которая включает в себя по меньшей мере часть лассо латентности, можно использовать любые подходящие методы. Например, можно проводить конкурентные анализы, в которых используются соответствующие полипептиды. Согласно некоторым вариантам осуществления области связывания можно определить с помощью HD-X или рентгеновской кристаллографии.

[268] Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело или фрагмент может связывать каждый из комплексов hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1 с KD, составляющей ≤ 500 пМ (необязательно ≤ 400 пМ, ≤ 300 пМ, ≤ 200 пМ или ≤ 100 пМ), как измерено с помощью титрования равновесного раствора, где антитело или фрагмент связывает LLC человека в области связывания, которая содержит по меньшей мере часть лассо латентности.

[269] Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело может дополнительно связывать LLC человека в дополнительной(ых) области(ях) связывания, которая(ые) содержит(ат) по меньшей мере часть домена фактора роста в комплексе proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное связывание происходит только в контексте комплекса латентности, так что антитело не связывается специфически со свободным фактором роста, который не связан с комплексом продомена. Дополнительная(ые) область(и) связывания в пределах домена фактора роста LLC могут включать в себя по меньшей мере часть белковых доменов, называемых «Finger-1» и/или «Finger-2». Следовательно, такое антитело может связывать комбинаторный эпитоп, который содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток лассо латентности и по меньшей мере один аминокислотный остаток домена фактора роста.

[270] Антитело может также связываться с высокой специфичностью и высокими аффинностями с соответствующими LLC дополнительных видов. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело проявляет видовую перекрестную реактивность с мышиными аналогами.

[271] В настоящем документе предусмотрены перекрестно-блокирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его фрагмент перекрестно блокирует или перекрестно конкурирует с одним из антител категории 5, где антитело характеризуется KD, составляющей ≤ 1 нМ по меньшей мере для одного из комплексов LLC человека (hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и/или hLRRC33-proTGFβ1), как измерено с помощью MSD-SET. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело характеризуется KD, составляющей ≤ 1 нМ для двух из комплексов LLC человека, выбранных из: hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, как измерено с помощью MSD-SET. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело характеризуется KD, составляющей ≤ 1 нМ для трех из комплексов LLC человека, выбранных из: hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, как измерено с помощью MSD-SET. Согласно предпочтительным вариантам осуществления, такое антитело характеризуется KD, составляющей ≤ 1 нМ для каждого из

комплексов LLC человека: hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1, как измерено с помощью MSD-SET. Согласно настоящему раскрытию, высокоаффинные антитела могут характеризоваться значением KD для конкретного антигена (например, антигенного комплекса), которое составляет 1 нМ или меньше, например, ≤ 1 нМ, ≤ 0,5 нМ, ≤ 400 пМ, ≤ 300 пМ, ≤ 200 пМ и ≤ 100 пМ, в состоянии равновесия.

Иллюстративные антитела согласно настоящему изобретению

[272] Иллюстративные антитела и соответствующие последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют такие антитела, применимые для проведения настоящего изобретения, включают в себя одну или несколько аминокислотных последовательностей CDR, показанных в таблицах 4 и 5. Каждый набор H-CDR (H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3), перечисленных в таблице 5, можно комбинировать с L-CDR (L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3), представленными в таблице 5.

[273] Таким образом, настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим шесть CDR (например, H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3), где H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 выбраны из наборов H-CDR антител, перечисленных в таблице 4, и где L-CDR1 содержит QASQDITNYLN (SEQ ID NO: 105), L-CDR2 содержит DASNLET (SEQ ID NO: 106), и L-CDR3 содержит QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12), где необязательно H-CDR1 может содержать FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107); H-CDR-2 может содержать YISPSADTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 103); и/или H-CDR3 может содержать ARGVLDYGDMLMP (SEQ ID NO: 6). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент содержит H-CDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107), H-CDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью YISPSADTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 103), и H-CDR-3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью ARGVLDYGDMLMP (SEQ ID NO: 6); L-CDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью QASQDITNYLN (SEQ ID NO: 105), L-CDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью DASNLET (SEQ ID NO: 106), и L-CDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12).

Таблица 4. Определяющие комплементарность области тяжелой цепи иллюстративных антител, как определено с использованием схемы нумерации, описанной Lu с соавт.

Ab	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
Ab4	FTFSSYSMN (SEQ ID NO: 108)	YISSSSSTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 109)	ARGVLDYGDMLDP (SEQ ID NO: 110)
Ab5	FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107)	YISPDASTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 111)	ARGVLDYGDMLDP (SEQ ID NO: 110)
Ab6	FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107)	YISPSADTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 103)	ARGVLDYGDMLMP (SEQ ID NO: 6)
Ab21	FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107)	YISPDASTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 111)	ARGVLDYGDMLDP (SEQ ID NO: 110)
Ab22	FTFGSFSMN (SEQ ID NO: 112)	YIHSDASTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 113)	ARGVLDYGDMLDP (SEQ ID NO: 110)
Ab23	FTFSSFSMN (SEQ ID NO: 114)	YISPSADTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 103)	ARGVLDYGDMLDP (SEQ ID NO: 110)
Ab24	FTFSSFAMY (SEQ ID NO: 115)	YISPDASTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 111)	ARGVLDYGDMLDP (SEQ ID NO: 110)
Ab25	FTFGSFSMD (SEQ ID NO: 116)	YISPDASTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 111)	ARGVLDYGDMLDP (SEQ ID NO: 110)
Ab26	FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107)	YISPDASTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 111)	ARGVLDYGDMLDP (SEQ ID NO: 110)
Ab27	FTFSFYAMN (SEQ ID NO: 117)	YISPDASTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 111)	ARGVLDYGDMLDP (SEQ ID NO: 110)
Ab28	FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107)	YISPDASTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 111)	VRGVLDYGDMLDP (SEQ ID NO: 118)
Ab29	FTFSSFAMN (SEQ ID NO: 119)	YISPDASTIYYAGSVKG (SEQ ID NO: 120)	VRAVLDYGDMLDP (SEQ ID NO: 121)
Ab30	FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107)	YISPDASTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 111)	ARGTLDYGDMLDP (SEQ ID NO: 122)

Ab31	FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107)	YISPDASTIYYADSV KG (SEQ ID NO: 111)	ARAVLDYGDMLDP (SEQ ID NO: 123)
Ab32	FTFSSFSMN (SEQ ID NO: 114)	YISPSADTIYYADSV KG (SEQ ID NO: 103)	ARGVWDMGDMLDP (SEQ ID NO: 124)
Ab33	FTFSSFSMN (SEQ ID NO: 114)	YISPSADTIYYADSV KG (SEQ ID NO: 103)	AHGVLDYGDMLDP (SEQ ID NO: 125)
Ab34	FTFAFYSMN (SEQ ID NO: 126)	YISPDASTIYYADSV KG (SEQ ID NO: 111)	ARGVLDYGDMLDP (SEQ ID NO: 110)

Таблица 5. Определяющие комплементарность области легкой цепи иллюстративных антител, как определено с использованием схемы нумерации по Kabat или системы нумерации Lu с соавт.

L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
QASQDITNYLN (SEQ ID NO: 105)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12)

[274] Определение последовательностей CDR в антителе зависит от конкретной применяемой схемы нумерации. Обычно используемые системы включают в себя без ограничения: систему нумерации Kabat, систему нумерации IMTG, систему нумерации Chothia и другие, такие как схема нумерации, описанная Lu с соавт. (Lu X et al., MAbs. 2019 Jan;11(1):45-57). Для иллюстрации ниже приведены для примера 6 последовательностей CDR Ab6, определенных с помощью четырех различных систем нумерации. Любые признанные в настоящей области техники системы нумерации CDR можно использовать для определения последовательностей CDR антител согласно настоящему раскрытию.

Таблица 6. Шесть CDR иллюстративного антитела (Ab6) на основе четырех схем нумерации

	Нумерация IMTG	**Нумерация Kabat**	**Нумерация Chothia**	**Система Lu с соавт.**
H-CDR1	GFTFSSFS (SEQ ID NO: 2)	SFSMD (SEQ ID NO: 102)	GFTFSSF (SEQ ID NO: 233)	FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107)
H-CDR2	ISPSADTI (SEQ ID NO: 4)	YISPSADTIYYADS VKG (SEQ ID NO: 103)	SPSADT (SEQ ID NO: 234)	YISPSADTIYYADSV KG (SEQ ID NO: 103)

H-CDR3	ARGVLDYGDM LMP (SEQ ID NO: 6)	GVLDYGDMLMP (SEQ ID NO: 104)	GVLDYGDML MP (SEQ ID NO: 104)	ARGVLDYGDMLMP (SEQ ID NO: 6)
L-CDR1	QDITNY (SEQ ID NO: 8)	QASQDITNYLN (SEQ ID NO: 105)	QASQDITNYLN (SEQ ID NO: 105)	QASQDITNYLN (SEQ ID NO: 105)
L-CDR2	DAS (SEQ ID NO: 10)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)	DASNLET (SEQ ID NO: 106)
L-CDR3	QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12)	QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12)	QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12)	QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12)

[275] Аминокислотные последовательности вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи иллюстративных антител согласно настоящему изобретению представлены в таблице 7. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления высокоаффинный, селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1 согласно настоящему раскрытию может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи (V_H) и вариабельный домен легкой цепи (V_L), где последовательности V_H и V_L выбраны из любого одного из наборов последовательностей V_H и V_L, перечисленных в таблице 7 ниже.

Таблица 7. Вариабельные домены тяжелой цепи и вариабельные домены легкой цепи иллюстративных антител

	Вариабельный домен тяжелой цепи (V_H)	**Вариабельный домен легкой цепи (V_L)**
Ab4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSS YSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTI YYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 127)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIT NYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPP WTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPDAST IYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIT NYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPP WTFGG GTKVEIK

	YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 128)	(SEQ ID NO: 15)
Ab6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPSADTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLMPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 13)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPDASTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 129)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGS FSMNWVRQAPGKGLEWVSYIHSDASTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 130)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS FSMNWVRQAPGKGLEWVSYISPSADTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 131)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab24	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSS FAMYWVRQAPGKGLEWVSYISPDASTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 132)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPDASTIYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 133)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)

Ab26	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPDAST IYYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRA EDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 134)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIT NYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPP WTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSF YAMNWVRQAPGKGLEWVSYISPDAS TIYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 135)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIT NYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPP WTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab28	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPDAST IYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVY YCVRGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 136)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIT NYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPP WTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab29	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGF TFSS FAMNWVRQAPGKGLEWVSYISPDAST IYYAG SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVY YCVRAVLDYGDMLDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 137)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIT NYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPP WTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab30	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPDAST IYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVY YCARGTLDYGDMLDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 138)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIT NYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPP WTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab31	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSS FSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPDAST IYYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRA EDTAVY YCARAVLDYGDMLDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 139)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIT NYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPP WTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab32	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIT NYLN

	FSMNWVRQAPGKGLEWVSYISPSADT IYYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRA EDTAVY YCARGVWDMGDMLDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO: 140)	WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPP WTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab33	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSS FSMNWVRQAPGKGLEWVSYISPSADT IYYAD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRA EDTAVY YCAHGVLDYGDMLDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 141)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIT NYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPP WTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)
Ab34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFAF YSMNWVRQAPGKGLEWVSYISPDAST IYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVY YCARGVLDYGDMLDPWGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 142)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIT NYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPP WTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 15)

[276] Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту который содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, где вариабельный домен тяжелой цепи характеризуется по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% и 100%) идентичности последовательности по отношению к любой из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из: Ab4, Ab5, Ab6, Ab21, Ab22, Ab23, Ab24, Ab25, Ab26, Ab27, Ab28, Ab29, Ab30, Ab31, Ab32, Ab33 и Ab34; и где вариабельный домен легкой цепи характеризуется по меньшей мере 90% идентичности по отношению к любой из последовательностей, выбранных из Ab4, Ab5, Ab6, Ab21, Ab22, Ab23, Ab24, Ab25, Ab26, Ab27, Ab28, Ab29, Ab30, Ab31, Ab32, Ab33 и Ab34, где необязательно вариабельный домен тяжелой цепи может необязательно характеризоваться по меньшей мере 95% идентичности последовательности, и/или вариабельный домен легкой цепи может характеризоваться по меньшей мере 95% (например, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% 99% и 100%) идентичности последовательности. Согласно некоторым вариантам осуществления вариабельный домен тяжелой цепи антитела или фрагмент характеризуется по меньшей мере 90% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 13, и где необязательно вариабельный домен легкой цепи антитела или фрагмент характеризуется по меньшей мере 90% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 15. Согласно некоторым вариантам осуществления вариабельный

домен тяжелой цепи антитела или фрагмент характеризуется по меньшей мере 95% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 13, и где необязательно вариабельный домен легкой цепи антитела или фрагмент характеризуется по меньшей мере 95% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 15. Согласно некоторым вариантам осуществления вариабельный домен тяжелой цепи антитела или фрагмент характеризуется по меньшей мере 98% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 13, и где необязательно вариабельный домен легкой цепи антитела или фрагмент характеризуется по меньшей мере 98% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 15. Согласно некоторым вариантам осуществления вариабельный домен тяжелой цепи антитела или фрагмент характеризуется 100% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 13, и где необязательно вариабельный домен легкой цепи антитела или фрагмент характеризуется 100% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 15.

[277] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, содержат аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 14, и аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 16. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 14, и аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 16.

[278] В некоторых примерах любое из антител согласно настоящему раскрытию, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, включают в себя любое антитело (включая в себя его антигенсвязывающие части), характеризующееся одной или несколькими последовательностями CDR (например, CDRH или CDRL), по существу сходными с CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и/или CDRL3. Например,

антитела могут включать в себя одну или несколько последовательностей CDR, как показано в таблице 4, содержащих вплоть до 5, 4, 3, 2 или 1 вариации аминокислотных остатков по сравнению с соответствующей областью CDR в любой из SEQ ID NO: 6, 12, 103, 105, 106, 107, 108, 109, 110 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125 и 126. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько из шести последовательностей CDR содержат вплоть до трех (3) аминокислотных замен по сравнению с последовательностями, представленными в таблице 4. Такие варианты антитела, содержащие вплоть до 3 аминокислотных замен на CDR, предусмотрены настоящим изобретением. Согласно некоторым вариантам осуществления такие вариантные антитела создаются в процессе оптимизации, таком как созревание аффинности. Полные аминокислотные последовательности для вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антител, перечисленных в таблице 7 (например, Ab6), а также последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи определенных антител, представлены ниже:

Ab3 – Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GGATYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSSGHWDFDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 95)

Ab6 – Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSFSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPS ADTIYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGVLDYGDMLMPWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 13)

Ab6 – Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE TGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 15)

Ab6 – Аминокислотная последовательность тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSFSMDWVRQAPGKGLEWVSYISPS ADTIYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGVLDYGDMLMPWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK

PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR
LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 17)

Ab6 – Последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTTCAGCATGGACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTCCCAGTGCA
GACACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
TGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGG
TGTACTACTGCGCCAGAGGGGTGCTCGACTACGGAGACATGTTAATGCCATGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCGTCGACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCT
CTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTG
AAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCC
GGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCG
TGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACC
ACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCT
TGCCCTCCCTGCCCTGCCCCTGAGTTCCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCTC
CTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGG
TGGACGTGTCCCAGGAAGATCCTGAGGTCCAGTTCAATTGGTACGTGGATGGCGTG
GAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCG
GGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACA
AGTGCAAGGTCAGCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAG
GCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTAGCCAGGAAGA
GATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACATGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGA
TATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGACCACCC
CTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACA
AGTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGC
ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGC (SEQ ID NO: 18)

Ab6 – Аминокислотная последовательность легкой цепи

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE
TGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQADNHPPWTFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 19)

Ab6 – Последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи (каппа человека)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
AGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTACCAACTATTTAAATTGGTATCA
GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGATGCATCCAATTTGGAAA
CAGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCA
TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTCAGCAGGCCGACAATC
ACCCTCCTTGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAACGTACGGTGGCT
GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCC
TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG
GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAG
CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG
AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 20)

[279] Согласно некоторым вариантам осуществления «процент идентичности» двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, измененный, как в Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Поиск белков BLAST может быть выполнен с помощью программы XBLAST, балл = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных представляющим интерес молекулам белка. Если между двумя последовательностями существуют промежутки, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

[280] В любом из антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, одна или несколько консервативных мутаций могут быть введены в CDR или каркасные последовательности в положениях, где остатки вряд ли будут участвовать во взаимодействии антитело-антиген. Согласно некоторым вариантам осуществления такая(ие) консервативная(ые) мутация(и) может(могут) быть введена(ы) в CDR или каркасные последовательности в положении(ях), где остатки, скорее всего, не будут участвовать во взаимодействии с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и комплексом LRRC33-TGFβ1, как определено на основании кристаллической структуры. Согласно некоторым вариантам осуществления

вероятную область взаимодействия (например, остатки, участвующие во взаимодействии антиген-антитело) можно вывести из известной структурной информации о другом антигене, которое характеризуется структурным сходством.

[281] Используемый в настоящем документе термин «консервативная аминокислотная замена» относится к аминокислотной замене, которая не изменяет характеристики относительного заряда или размера белка, в котором производится аминокислотная замена. Варианты могут быть получены в соответствии со способами изменения полипептидной последовательности, известными среднему специалисту в настоящей области техники, например, в справочных материалах, в которых собраны такие методы, например, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., Eds. , Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, или Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот включают в себя замены, сделанные среди аминокислот в следующих группах: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; и (g) E, D.

[282] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, представленные в настоящем документе, содержат мутации, которые придают антителам требуемые свойства. Например, во избежание возможных осложнений из-за обмена Fab-плеча, который, как известно, происходит с нативными mAb IgG4, представленные в настоящем документе антитела могут содержать стабилизирующую мутацию «Adair» (Angal et al., “A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody,” Mol Immunol 30, 105-108; 1993), где серин 228 (нумерация ЕС; остаток 241 по нумерации Kabat) превращается в пролин, что приводит к IgG1-подобной (CPPCP (SEQ ID NO: 54)) последовательности петли. Соответственно, любое из антител может включать в себя стабилизирующую мутацию «Adair» или аминокислотную последовательность CPPCP (SEQ ID NO: 54).

[283] Специфические в отношении изоформы, контекстно-независимые ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему раскрытию могут необязательно содержать константные области антитела или их части. Например, домен VL может быть прикреплен на своем С-конце к константному домену легкой цепи, такому как Сκ или Сλ. Аналогично, домен VH или его часть может быть прикреплен ко всей или части тяжелой цепи, такой как IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и к любому подклассу изотипа. Антитела могут включать в себя подходящие константные области (см., например, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991)). Следовательно, антитела в рамках настоящего раскрытия могут включать в себя

домены VH и VL или их антигенсвязывающую часть, объединенные с любыми подходящими константными областями.

[284] Дополнительно или альтернативно, такие антитела могут включать в себя или не включать в себя каркасную область антител с SEQ ID NO: 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142 и 15. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и комплексом LRRC33-TGFβ1, являются мышиными антителами и включают в себя последовательности каркасной области мыши.

[285] Согласно некоторым вариантам осуществления такие антитела связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и комплексом LRRC33-TGFβ1 с относительно высокой аффинностью, например, с KD менее 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M и ниже. Например, такие антитела могут связываться с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1 с аффинностью от 5 пМ до 1 нМ, например, от 10 пМ до 1 нМ, например, от 10 до 100 пМ. Настоящее раскрытие также включает в себя антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с любым из описанных в настоящем документе антител за связывание с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1 и которые имеют значение KD, составляющее 1 нМ или ниже (например, 1 нМ или ниже, 500 пМ или ниже, 100 пМ или ниже). Аффинность и кинетика связывания антител, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, могут быть протестированы с использованием любого подходящего способа, включая в себя без ограничения технологию на основе биосенсоров (например, OCTET® или BIACORE) и технологию на основе титрования равновесного раствора (например, MSD-SET).

[286] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы ассоциированного с клеткой TGFβ1 (например, TGFβ1, презентированный GARP, и TGFβ1, презентированный LRRC33) согласно настоящему изобретению включают в себя антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с таким комплексом (например, GARP-про/латентный TGFβ1 и LRRC33-про/латентный TGFβ1) и запускают интернализацию комплекса. Этот способ действия вызывает удаление или истощение неактивных комплексов TGFβ1 (например, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1) с поверхности клетки (например, Treg, макрофаги и т.д.), тем самым уменьшая TGFβ1, доступный для активации. Согласно некоторым вариантам осуществления такие антитела

или их фрагменты связывают целевой комплекс pH-зависимым образом, так что связывание происходит при нейтральном или физиологическом pH, но антитело диссоциирует от своего антигена при кислом pH; или скорости диссоциации выше при кислом pH, чем при нейтральном pH. Такие антитела или их фрагменты могут функционировать как рециркулирующие антитела.

Антитела, конкурирующие с высокоаффинными специфическими в отношении изоформы ингибирующими антителами к TGFβ1

[287] Аспекты согласно настоящему раскрытию относятся к антителам, которые конкурируют или перекрестно конкурируют с любым из антител, представленных в настоящем документе. Используемый в настоящем документе термин «конкурировать» в отношении антитела, означает, что первое антитело связывается с эпитопом (например, эпитопом комплекса GARP-proTGFβ1, комплекса LTBP1-proTGFβ1, комплекса LTBP3-proTGFβ1 и комплекса LRRC33-proTGFβ1) способом, достаточно похожим на связывание второго антитела или перекрывающимся со связыванием второго антитела, так что результат связывания первого антитела с его эпитопом обнаруживаемым образом снижается в присутствии второго антитела по сравнению со связыванием первого антитела в отсутствие второго антитела. Альтернатива, когда связывание второго антитела с его эпитопом также обнаруживаемым образом снижается в присутствии первого антитела, может, но не обязательно, иметь место. Т.е. первое антитело может ингибировать связывание второго антитела с его эпитопом, при этом это второе антитело не ингибирует связывание первого антитела с его соответствующим эпитопом. Однако, когда каждое антитело обнаружимо ингибирует связывание другого антитела с его эпитопом или лигандом в той же, большей или меньшей степени, говорят, что антитела «перекрестно конкурируют» друг с другом за связывание их соответствующего(их) эпитопа(ов). Как конкурирующие, так и перекрестно-конкурирующие антитела включены в объем настоящего раскрытия. Независимо от механизма, с помощью которого происходит такая конкуренция или перекрестная конкуренция (например, стерическое препятствие, конформационное изменение или связывание с общим эпитопом или его частью), квалифицированному специалисту понятно, что такие конкурирующие и/или перекрестно конкурирующие антитела предусмотрены и могут быть применимы для способов и/или композиций, представленных в настоящем документе. Термин «перекрестно-блокирующие» может использоваться взаимозаменяемо.

[288] Два разных моноклональных антитела (или антигенсвязывающие фрагменты), которые связывают один и тот же антиген, могут быть способны одновременно

связываться с антигеном, если сайты связывания находятся достаточно далеко друг от друга в трехмерном пространстве, так что каждое связывание не мешает другому связыванию. Напротив, два разных моноклональных антитела могут иметь области связывания антигена, которые являются одинаковыми или перекрываются, и в этом случае связывание первого антитела может препятствовать способности второго антитела связывать антиген, или наоборот. В последнем случае говорят, что два антитела «*перекрестно блокируют*» друг друга по отношению к одному и тому же антигену.

[289] Эксперименты по «сортировке» антител применимы для классификации множества антител, созданных против одного и того же антигена, в различные «группы» на основе относительной активности перекрестного блокирования. Таким образом, каждая «группа» представляет собой отдельную(ые) область(и) связывания антигена. Антитела в одной и той же группе по определению перекрестно блокируют друг друга. Сортировку можно исследовать с помощью стандартных анализов связывания in vitro, таких как Biacor или Octet®, с использованием стандартных условий тестирования, например, в соответствии с инструкциями производителя (например, связывание при комнатной температуре, ~20-25°C).

[290] Аспекты согласно настоящему раскрытию относятся к антителам, которые конкурируют или перекрестно конкурируют с любыми конкретными антителами или их антигенсвязывающими частями, как предусмотрено в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с тем же эпитопом или рядом с таким же эпитопом, что и любое из антител, представленных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть связывается рядом с эпитопом, если оно связывается в пределах 15 или менее аминокислотных остатков эпитопа. Согласно некоторым вариантам осуществления любое антитело или его антигенсвязывающая часть, как предусмотрено в настоящем документе, связывается в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных остатков эпитопа, который связывается любым из представленных в настоящем документе антител.

[291] Согласно другому варианту осуществления в настоящем документе предусмотрено антитело или его антигенсвязывающая часть, которые конкурируют или перекрестно конкурируют за связывание с любым из антигенов, предусмотренных в настоящем документе (например, комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1) с равновесной константой диссоциации, K_D, между антителом и белом, составляющей меньше чем 10^{-8} М. Согласно другим вариантам осуществления антитело конкурирует или перекрестно конкурирует за

связывание с любым из антигенов, предусмотренных в настоящем документе, с K_D в диапазоне от 10^{-12} М до 10^{-9} М. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе предусмотрено антитело к TGFβ1 или его антигенсвязывающая часть, которые конкурируют за связывание с антителом или его антигенсвязывающей частью, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе предусмотрено антитело к TGFβ1 или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе.

[292] Любое из представленных в настоящем документе антител можно охарактеризовать с использованием любых подходящих способов. Например, одним из способов является идентификация эпитопа, с которым связывается антиген, или «картирование эпитопа». Существует множество подходящих способов для картирования и характеристики местоположения эпитопов на белках, включая в себя определение кристаллической структуры комплекса антитело-антиген, конкурентные анализы, анализы экспрессии генных фрагментов и анализы на основе синтетических пептидов, как описано, например, в Главе 11 Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999. В дополнительном примере можно использовать картирование эпитопа для определения последовательности, с которой связывается антитело. Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп, т.е. содержаться в одном отрезке аминокислот, или конформационный эпитоп, образованный за счет трехмерного взаимодействия аминокислот, который не обязательно может содержаться в одном отрезке (линейная последовательность первичной структуры). Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп представляет собой эпитоп TGFβ1, который доступен только для связывания антителом или его антигенсвязывающей частью, описанными в настоящем документе, когда TGFβ1 находится в комплексе GARP-proTGFβ1, комплексе LTBP1-proTGFβ1, комплексе LTBP3-proTGFβ1 или комплексе LRRC33-proTGFβ1. Пептиды различной длины (например, длиной по меньшей мере 4-6 аминокислот) могут быть выделены или синтезированы (например, рекомбинантно) и использованы для анализов связывания с антителом. В другом примере эпитоп, с которым связывается антитело, можно определить в систематическом скрининге с использованием перекрывающихся пептидов, полученных из последовательности целевого антигена, и определения связывания антителом. В соответствии с анализами экспрессии фрагментов гена открытая рамка считывания, кодирующая целевой антиген, фрагментируется либо случайным образом, либо специфическими генетическими конструкциями, и определяется реактивность экспрессируемых фрагментов антигена с тестируемым антителом.

Фрагменты гена можно, например, получить с помощью ПЦР и затем транскрибировать и транслировать в белок in vitro в присутствии радиоактивных аминокислот. Связывание антитела с радиоактивно мечеными фрагментами антигена затем определяют иммунопреципитацией и гель-электрофорезом. Определенные эпитопы также можно идентифицировать с использованием больших библиотек случайных пептидных последовательностей, отображаемых на поверхности фаговых частиц (фаговых библиотек). Альтернативно, заданная библиотека перекрывающихся пептидных фрагментов может быть протестирована на связывание с тестируемым антителом в простых анализах связывания. В дополнительном примере могут быть выполнены мутагенез антигенсвязывающего домена, эксперименты по замене домена и сканирующий аланином мутагенез для идентификации остатков, требуемых, достаточных и/или необходимых для связывания эпитопа. Например, эксперименты по замене домена могут быть выполнены с использованием мутанта целевого антигена, в котором различные фрагменты комплекса GARP-proTGFβ1, комплекса LTBP1-proTGFβ1, комплекса LTBP3-proTGFβ1 и/или комплекса proLRRC33-TGFβ1 были замещены (заменены) последовательностями из близкородственного, но отличного по антигенам белка, такого как другой представитель семейства белков TGFβ (например, GDF11).

[293] В качестве альтернативы, конкурентные анализы могут быть выполнены с использованием других антител, которые, как известно, связываются с тем же антигеном, чтобы определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и другие антитела. Конкурентные анализы хорошо известны специалистам в настоящей области техники.

[294] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение включает в себя антитела (например, иммуноглобулины, антигенсвязывающие фрагменты и т.д.), которые перекрестно блокируют (перекрестно конкурируют) с любым из антител категории 1, категории 2, категории 3, категории 4 и/или категория 5. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию можно получить с помощью способа, предусматривающего стадию: выбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые перекрестно конкурируют с антителом категории 1; и составление антитела в виде фармацевтической композиции.

[295] Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию можно получить с помощью способа, предусматривающего стадию: выбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые перекрестно конкурируют с антителом категории 2; и составление антитела в виде фармацевтической композиции.

[296] Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию можно получить с помощью способа, предусматривающего стадию: выбора

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые перекрестно конкурируют с антителом категории 3; и составление антитела в виде фармацевтической композиции.

[297] Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию можно получить с помощью способа, предусматривающего стадию: выбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые перекрестно конкурируют с антителом категории 4; и составление антитела в виде фармацевтической композиции.

[298] Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию можно получить с помощью способа, предусматривающего стадию: выбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые перекрестно конкурируют с антителом категории 5; и составление антитела в виде фармацевтической композиции.

[299] Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию можно получить с помощью способа, предусматривающего стадию: выбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые перекрестно конкурируют с антителом, выбранным из группы, состоящей из Ab4, Ab5, Ab6, Ab21, Ab22, Ab23, Ab24, Ab25, Ab26, Ab27, Ab28, Ab29, Ab30, Ab31, Ab32, Ab33 и Ab34; и составление в виде фармацевтической композиции.

[300] Предпочтительно, антитело, выбранное с помощью способа, представляет собой высокоаффинное связывающее средство, характеризующееся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с каждым из LLC человека (например, hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGF) с KD, составляющей $\leq$ 5 нМ, как измерено с помощью титрования равновесного раствора. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело соответствует одному или нескольким критериям из категории 1, категории 2, категории 3, категории 4 и категории 5. Такие перекрестно конкурирующие антитела можно использовать при лечении у субъекта показаний, связанных с TGFβ1, в соответствии с настоящим раскрытием.

Различные модификации и варианты антител

[301] Неограничивающие варианты, модификации и признаки любых антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предусмотренных настоящим раскрытием, кратко обсуждаются ниже. Также представлены варианты осуществления соответствующих аналитических способов.

[302] Встречающиеся в природе структурные единицы антител, как правило, содержат тетрамер. Каждый такой тетрамер, как правило, состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара содержит одну полноразмерную «легкую» (согласно определенным вариантам осуществления приблизительно 25 кДа) и одну полноразмерную

«тяжелую» цепь (согласно определенным вариантам осуществления приблизительно 50- 70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи, как правило, включает в себя вариабельную область из приблизительно 100-110 или более аминокислот, которая, как правило, отвечает за распознавание антигена. Карбокси-концевая часть каждой цепи, как правило, определяет константную область, которая может отвечать за эффекторную функцию. Легкие цепи человеческого антитела, как правило, классифицируются как легкие цепи каппа и лямбда. Тяжелые цепи, как правило, классифицируются как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон и определяют изотип антитела. Антитело может принадлежать к любому типу (например, IgM, IgD, IgG, IgA, IgY и IgE) и классу (например, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgM_1, IgM_2, IgA_1 и IgA_2). Внутри полноразмерных легких и тяжелых цепей, как правило, вариабельные и константные области соединены областью «J» из приблизительно 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает в себя область «D» из приблизительно 10 дополнительных аминокислот (см., например, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (полностью включено посредством ссылки)). Вариабельные области каждой пары легкой/тяжелой цепи, как правило, образуют сайт связывания антигена.

[303] Вариабельные области, как правило, проявляют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, также называемыми определяющими комплементарность областями или CDR. CDR из двух цепей каждой пары, как правило, выравниваются по каркасным областям, что может обеспечить связывание со специфическим эпитопом. От N-конца до С-конца вариабельные области как легкой, так и тяжелой цепей, как правило, содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Отнесение аминокислот к каждому домену, как правило, соответствует определениям Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 и 1991)) или Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342: 878-883. CDR легкой цепи также можно обозначать как CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, а CDR тяжелой цепи также можно обозначать как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело может содержать небольшое количество аминокислотных делеций на карбокси-конце тяжелой(ых) цепи(ей). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую делеции из 1-5 аминокислот на карбокси-конце тяжелой цепи. Согласно определенным вариантам осуществления окончательное определение CDR и идентификация остатков, составляющих сайт связывания антитела, осуществляется путем выяснения структуры антитела и/или определения структуры комплекса антитело-лиганд. Согласно определенным вариантам

осуществления это может быть выполнено с помощью любого из множества методов, известных специалистам в настоящей области техники, таких как рентгеновская кристаллография. Согласно некоторым вариантам осуществления можно использовать различные способы анализа для идентификации или аппроксимации областей CDR. Примеры таких способов включают в себя без ограничения определение согласно Kabat, определение согласно Chothia, определение согласно AbM, определение, описанное Lu с соавт. (см. выше), и «контактное» определение.

[304] Антитело с «созревшей аффинностью» представляет собой антитело с одним или несколькими изменениями в одной или нескольких его CDR, которые приводят к повышению аффинности антитела к антигену по сравнению с исходным антителом, которое обладает таким изменением(ями). Иллюстративные антитела с созревшей аффинностью будут иметь наномолярные или даже пикомолярные аффинности (например, KD в диапазоне ~ 10^{-9} M-10^{-12} M) к целевому антигену. Антитела с созревшей аффинностью получают способами, известными в настоящей области техники. Marks et al. (1992) Bio/Technology 10: 779-783 описывает созревание аффинности путем перетасовки доменов VH и VL. Случайный мутагенез остатков CDR и/или каркасных остатков описан Barbas, et al. (1994) Proc Nat. Acad. Sci. USA 91: 3809-3813; Schier et al. (1995) Gene 169: 147- 155; Yelton et al., (1995) J. Immunol. 155: 1994-2004; Jackson et al. (1995) J. Immunol. 154(7): 3310-9; и Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226: 889-896; и селективная мутация в положениях селективного мутагенеза, положениях контакта или гипермутации с аминокислотным остатком, повышающим активность, описана в патенте США № 6914128. Как правило, исходное антитело и его потомство с созревшей аффинностью (например, производные) сохраняют одну и ту же область связывания в антигене, хотя определенные взаимодействия на молекулярном уровне могут изменяться из-за чередования(й) аминокислотных остатков, вносимого(ых) созреванием аффинности.

[305] Термин «антитело с привитой CDR» относится к антителам, которые содержат последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей одного вида, но в которых последовательности одной или нескольких областей CDR VH и/или VL заменены на последовательности CDR другого вида, такие как антитела, содержащие вариабельные области тяжелой и легкой цепи мыши, в которых одна или несколько мышиных CDR (например, CDR3) заменены последовательностями CDR человека.

[306] Термин «химерное антитело» относится к антителам, которые содержат последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепи от одного вида и последовательности константных областей от другого вида, такие как антитела,

содержащие вариабельные области тяжелой и легкой цепи мыши, связанные с константными областями человека.

[307] Используемый в настоящем документе термин «каркасная область» или «каркасная последовательность» относится к остальным последовательностям вариабельной области за вычетом CDR. Поскольку точное определение последовательности CDR может быть определено разными системами, значение каркасной последовательности может соответственно интерпретироваться по-разному. Шесть CDR (CDR-L1, -L2 и -L3 легкой цепи и CDR-H1, -H2 и -H3 тяжелой цепи) также делят каркасные области легкой цепи и тяжелой цепи на четыре подобласти (FR1, FR2, FR3 и FR4) на каждой цепи, в которой CDR1 расположена между FR1 и FR2, CDR2 между FR2 и FR3 и CDR3 между FR3 и FR4. Без указания конкретных подобластей как FR1, FR2, FR3 или FR4, каркасная область, как называют другие источники, представляет собой комбинированные FR в вариабельной области отдельной, встречающейся в природе цепи иммуноглобулина. В настоящем контексте FR представляет собой одну из четырех подобластей, а FR представляют две или более из четырех подобластей, составляющих каркасную область.

[308] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасную область 1 тяжелой цепи (H-FR1), характеризующуюся следующей аминокислотной последовательностью с необязательно 1, 2 или 3 аминокислотными заменами: EVQLVESGGGLVQPG**G**SLRLSC**A**ASG (SEQ ID NO: 174). Например, остаток Gly в положении 16 может быть заменен на Arg (R); и/или остаток Ala в положении 23 может быть заменен на Thr (T).

[309] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасную область 2 тяжелой цепи (H-FR2), характеризующуюся следующей аминокислотной последовательностью с необязательно 1, 2 или 3 аминокислотными заменами: WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO: 175).

[310] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасную область 3 тяжелой цепи (H-FR3), характеризующуюся следующей аминокислотной последовательностью с необязательно 1, 2 или 3 аминокислотными заменами: RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 176). Например, остаток Ser в положении 12 может быть заменен на Thr (T).

[311] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасную область 4 тяжелой цепи (H-FR4), характеризующуюся следующей аминокислотной последовательностью с необязательно 1, 2 или 3 аминокислотными заменами: WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 177).

[312] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасную область 1 легкой цепи (L-FR1), характеризующуюся следующей аминокислотной последовательностью с необязательно 1, 2 или 3 аминокислотными заменами: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 178).

[313] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасную область 2 легкой цепи (L-FR2), характеризующуюся следующей аминокислотной последовательностью с необязательно 1, 2 или 3 аминокислотными заменами: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 179).

[314] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасную область 3 легкой цепи (L-FR3), характеризующуюся следующей аминокислотной последовательностью с необязательно 1, 2 или 3 аминокислотными заменами: GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC (SEQ ID NO: 180).

[315] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасную область 4 легкой цепи (L-FR4), характеризующуюся следующей аминокислотной последовательностью с необязательно 1, 2 или 3 аминокислотными заменами: FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 181).

[316] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина константного домена IgM человека, константного домена IgG человека, константного домена IgG1 человека, константного домена IgG2 человека, константного домена IgG2A человека, константного домена IgG2B человека, константного домена IgG2 человека, константного домена IgG3 человека, константного домена IgG3 человека, константного домена IgG4 человека, константного домена IgA человека, константного домена IgA1 человека, константного домена IgA2 человека, константного домена IgD человека или константного домена IgE человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина константного домена IgG1 человека или константного домена IgG4 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина константного домена IgG4 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина человека константного домена IgG4 человека, характеризующийся замену в основной цепи Ser на Pro, которая дает в результате IgG1-подобный шарнир и допускает образование межцепочечных дисульфидных связей.

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

[318] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой IgG, содержащий четыре полипептидных цепи, которые представляют собой две тяжелые цепи и две легкие цепи.

[319] Согласно некоторым вариантам осуществления указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело, диатело или химерное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой человеческое антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит каркас, характеризующийся аминокислотной последовательностью зародышевой линии человека.

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

[321] Используемый в настоящем документе термин «ген антитела зародышевой линии» или «фрагмент гена» относится к последовательности иммуноглобулина, кодируемой нелимфоидными клетками, которые не подверглись процессу созревания, который приводит к генетической перестройке и мутации для экспрессии определенного иммуноглобулина (см., например, Shapiro et al. (2002) Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200; Marchalonis et al. (2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484: 13-30). Одно из преимуществ, обеспечиваемых различными вариантами осуществления настоящего раскрытия, проистекает из признания того факта, что гены антитела зародышевой линии с большей вероятностью, чем гены зрелого антитела, сохранят структуры последовательностей незаменимых аминокислот, характерные для особей данного вида, следовательно, с меньшей вероятностью будут распознаны как происходящие от чужеродного источника при терапевтическом использовании у этого вида.

[322] Используемый в настоящем документе термин «нейтрализация» относится к противодействию биологической активности антигена (например, целевого белка), когда связывающий белок специфически связывается с антигеном. Согласно одному из вариантов осуществления нейтрализующий связывающий белок связывается с антигеном/мишенью, например, цитокином, киназой, фактором роста, белком клеточной поверхности, растворимым белком, фосфатазой или рецепторным лигандом, и снижает его биологическую активность по меньшей мере приблизительно на 20%, 40 %, 60%, 80%, 85%,

90%, 95%. 96%, 97%, 98%, 99% или больше. Согласно некоторым вариантам осуществления нейтрализующее антитело к фактору роста специфически связывает зрелый растворимый фактор роста, который был высвобожден из латентного комплекса, тем самым препятствуя его способности связываться со своим рецептором, чтобы вызвать нижележащую передачу сигналов. Согласно некоторым вариантам осуществления зрелый фактор роста представляет собой TGFβ1 или TGFβ3.

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

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

[325] Используемый в настоящем документе термин «рекомбинантное человеческое антитело» предназначен для включения всех человеческих антител, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, таких как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (описаны далее в Разделе II C ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител (Hoogenboom, H.R. (1997) TIB Tech. 15: 62-70; Azzazy, H. and Highsmith, W.E. (2002) Clin. Biochem. 35: 425-445; Gavilondo, J.V. and Larrick, J.W. (2002) BioTechniques 29: 128-145; Hoogenboom, H. and Chames, P. (2000) Immunol. Today 21: 371-378, включенные в настоящий документ посредством ссылки), антитела, выделенные от животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулинов человека (см. Taylor, L. D. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295; Kellermann, S-A. and Green, L.L. (2002) Cur. Opin. in Biotechnol. 13: 593-597; Little, M. et al. (2000) Immunol. Today 21: 364-370) или

антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим средством, которое предусматривает сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат вариабельные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако согласно определенным вариантам осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергаются мутагенезу in vitro (или, когда используется животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу in vivo) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантного антитела представляют собой последовательности, которые, хотя и происходят из последовательностей VH и VL зародышевой линии человека и связаны с ними, могут не существовать в природе в репертуаре человеческих антител зародышевой линии in vivo.

[326] Используемый в настоящем документе термин «иммуноглобулин с двойным вариабельным доменом» или «DVD-IgTM» и тому подобное включают в себя связывающие белки, содержащие полипептид DVD спаренной тяжелой цепи и полипептид DVD легкой цепи, причем каждая спаренная тяжелая и легкая цепь обеспечивает два антигенсвязывающих сайта. Каждый сайт связывания включает в себя всего 6 CDR, участвующих в связывании антигена, на сайт связывания антигена. DVD-IgTM, как правило, имеет два плеча, связанных друг с другом, по меньшей мере частично, за счет димеризации доменов CH3, причем каждое плечо DVD является биспецифическим, обеспечивая иммуноглобулин с четырьмя сайтами связывания. DVD-IgTM предоставлены в патентных публикациях США №№ 2010/0260668 и 2009/0304693, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки, включая в себя перечни последовательностей.

[327] Используемый в настоящем документе термин «иммуноглобулин с тройным вариабельным доменом» или «TVD-Ig» и тому подобное представляют собой связывающие белки, содержащие полипептид связывающего белка TVD спаренной тяжелой цепи и полипептид связывающего белка TVD легкой цепи, при этом каждая спаренная тяжелая и легкая цепь обеспечивает три антигенсвязывающих сайта. Каждый сайт связывания включает в себя всего 6 CDR, участвующих в связывании антигена на сайт связывания антигена. Связывающий белок TVD может иметь два плеча, связанных друг с другом, по меньшей мере частично, за счет димеризации доменов CH3, причем каждое плечо связывающего белка TVD является триспецифическим, обеспечивая связывающий белок с шестью сайтами связывания.

[328] Используемый в настоящем документе термин «иммуноглобулин рецептор-антитело» или «RAb-Ig» и тому подобное представляют собой связывающие белки, содержащие полипептид RAb тяжелой цепи и полипептид RAb легкой цепи, которые вместе образуют в общей сложности три антигенсвязывающих сайта. Один антигенсвязывающий сайт формируется путем спаривания вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи антитела, присутствующих в каждом из полипептида RAb тяжелой цепи и полипептида RAb легкой цепи, с образованием единого сайта связывания с всего 6 CDR, обеспечивающих первый сайт связывания антигена. Каждый полипептид RAb тяжелой цепи и полипептид RAb легкой цепи включают в себя рецепторную последовательность, которая независимо связывает лиганд, обеспечивая второй и третий сайты связывания «антигена». RAb-Ig, как правило, имеет два плеча, связанных друг с другом, по меньшей мере частично, за счет димеризации доменов CH3, при этом каждое плечо RAb-Ig является триспецифичным, обеспечивая иммуноглобулин с шестью сайтами связывания. RAb-Ig описаны в публикации заявки на патент США № 2002/0127231, полное содержание которой, включая в себя перечни последовательностей, включено в настоящий документ посредством ссылки).

[329] Используемый в настоящем документе термин «биспецифическое антитело» и в отличие от «биспецифического полу-Ig связывающего белка» или «биспецифического (полу-Ig) связывающего белка» относится к полноразмерным антителам, которые получены с помощью технологии квадромы (см. Milstein, C. and Cuello, A.C. (1983) Nature 305(5934): p. 537-540), путем химической конъюгации двух различных моноклональных антител (см. Staerz, U.D. et al. (1985) Nature 314(6012): 628-631), или с помощью «выступ-во-впадину» или аналогичных подходов, которые вводят мутации в области Fc, которые не ингибируют димеризацию CH3-CH3 (см. Holliger, P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90(14): 6444-6448), что приводит к множеству различных видов иммуноглобулинов, из которых только одно является функциональным биспецифическим антителом. По молекулярной функции биспецифическое антитело связывает один антиген (или эпитоп) на одном из двух своих связывающих плеч (одна пара HC/LC) и связывает другой антиген (или эпитоп) на своем втором плече (другая пара HC/LC). По этому определению биспецифическое антитело имеет два различных антигенсвязывающих плеча (как по специфичности, так и по последовательностям CDR) и является моновалентным для каждого антигена, с которым оно связывается.

[330] Термин «антитело с двойной специфичностью» в контексте настоящего описания и в отличие от биспецифического полу-Ig связывающего белка или биспецифического связывающего белка относится к полноразмерным антителам, которые

могут связывать два разных антигена (или эпитопа) в каждом из двух его связывающих плеч (пара HC/LC) (см. публикацию PCT № WO 02/02773). Соответственно, связывающий белок с двойной специфичностью имеет два идентичных антигенсвязывающих плеча с идентичной специфичностью и идентичными последовательностями CDR и является бивалентным для каждого антигена, с которым он связывается.

[331] Используемый в настоящем документе термин «Kon» предназначен для обозначения константы скорости ассоциации связывающего белка (например, антитела) с антигеном с образованием, например, комплекса антитело/антиген, как известно в настоящей области техники. «Kon» также известен под термином «константа скорости ассоциации» или «ka», которые используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Это значение, указывающее на скорость связывания антитела с его антигеном-мишенью или скорость образования комплекса между антителом и антигеном, также показано уравнением: антитело («Ab») + антиген («Ag») → Ab-Ag.

[332] Используемый в настоящем документе термин «Koff» предназначен для обозначения константы скорости диссоциации связывающего белка (например, антитела), например, из комплекса антитело/антиген, как известно в настоящей области техники. «Koff» также известен под термином «константа скорости диссоциации» или «kd», которые используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Это значение указывает на скорость диссоциации антитела от его целевого антигена или разделение комплекса Ab-Ag с течением времени на свободное антитело и антиген, как показано уравнением: Ab + Ag←Ab-Ag.

[333] Термины «равновесная константа диссоциации» или «KD», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к значению, полученному при измерении титрования в состоянии равновесия или путем деления константы скорости диссоциации (k*off*) на константу скорости ассоциации (k*on*). Константа скорости ассоциации, константа скорости диссоциации и равновесная константа диссоциации используются для представления аффинности связывания связывающего белка, например антитела, с антигеном. Способы определения констант скорости ассоциации и диссоциации хорошо известны в настоящей области техники. Использование методов, основанных на флуоресценции, обеспечивает высокую чувствительность и возможность исследовать образцы в физиологических буферах в состоянии равновесия. Могут быть использованы другие экспериментальные подходы и инструменты, такие как анализ BIAcore® (анализ биомолекулярного взаимодействия) (например, инструмент, доступный от BIAcore International AB, компании GE Healthcare, Уппсала, Швеция). Кроме того, также можно

использовать анализ KinExA® (анализ кинетического исключения), доступный от Sapidyne Instruments (Бойсе, Айдахо).

[334] Используемые в настоящем документе термины «кристалл» и «кристаллизованный» относятся к связывающему белку (например, антителу) или его антигенсвязывающей части, которая существует в форме кристалла. Кристаллы представляют собой одну из форм твердого состояния вещества, которая отличается от других форм, таких как аморфное твердое состояние или жидкокристаллическое состояние. Кристаллы состоят из регулярных повторяющихся трехмерных упорядоченных групп атомов, ионов, молекул (например, белков, таких как антитела) или молекулярных ансамблей (например, комплексов антиген/антитело). Эти трехмерные упорядоченные группы организованы в соответствии с определенными математическими соотношениями, которые хорошо известны в настоящей области техники. Основная единица или строительный блок, который повторяется в кристалле, называется асимметричной единицей. Повторение асимметричной единицы в пространственной конфигурации, которая соответствует заданной, четко определенной кристаллографической симметрии, обеспечивает «элементарную ячейку» кристалла. Повторение элементарной ячейки путем регулярных перемещений во всех трех измерениях обеспечивает кристалл. См. Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ed., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999). Термин «линкер» используется для обозначения полипептидов, содержащих два или более аминокислотных остатка, соединенных пептидными связями, и используется для связывания одной или нескольких антигенсвязывающих частей. Такие линкерные полипептиды хорошо известны в настоящей области техники (см., например, Holliger, P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R.J. et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Примеры линкеров включают в себя без ограничения ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 55), ASTKGP (SEQ ID NO: 56); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 57); TVAAP (SEQ ID NO: 58); AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 59); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 60); AKTTPKLGG (SEQ ID NO: 61); SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 62); SAKTTP (SEQ ID NO: 63); RADAAP (SEQ ID NO: 64); RADAAPTVS (SEQ ID NO: 65); RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 66); RADAAAA(G4S)4 (SEQ ID NO: 67); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 68); ADAAP (SEQ ID NO: 69); ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 70); QPKAAP (SEQ ID NO: 71); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 72); AKTTPP (SEQ ID NO: 73); AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 74); AKTTAP (SEQ ID NO: 75); AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 76); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 77); GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 78); GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 79); GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 80);

TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 81); и ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 82).

[335] «Метка» и «обнаруживаемая метка» или «обнаруживаемый фрагмент» означают фрагмент, прикрепленный к партнеру специфического связывания, такому как антитело или аналит, например, для осуществления реакции между представителями пары специфического связывания, такими как антитело и аналит, поддающиеся обнаружению, и партнер по специфическому связыванию, например антитело или аналит, помеченные таким образом, называются «помеченные обнаруживаемым образом». Таким образом, используемый в настоящем документе термин «меченый связывающий белок» относится к белку со встроенной меткой, которая обеспечивает идентификацию связывающего белка. Согласно одному из вариантов осуществления метка представляет собой обнаруживаемый маркер, который может производить сигнал, который может быть детектирован визуальными или инструментальными средствами, например, включение радиоактивно меченной аминокислоты или прикрепление к полипептиду биотинильных фрагментов, которые могут быть обнаружены меченным авидином (например, стрептавидин, содержащий флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которая может быть обнаружена оптическими или колориметрическими методами). Примеры меток для полипептидов включают в себя без ограничения следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^{18}F, ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{68}Ga, ^{18}F, ^{89}Zr, ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho и ^{153}Sm); хромогены; флуоресцентные метки (например, люминофоры FITC, родамин и лантаноиды); ферментные метки (например, пероксидаза хрена, люцифераза и щелочная фосфатаза); хемилюминесцентные маркеры; биотинильные группы; заранее определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пар лейциновой молнии, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания металлов и метки эпитопов); и магнитные агенты, такие как хелаты гадолиния. Репрезентативные примеры меток, обычно используемых для иммуноанализов, включают в себя фрагменты, которые производят свет, например, соединения акридиния, и фрагменты, которые производят флуоресценцию, например флуоресцеин. В настоящем документе описаны другие метки. В этом отношении сам фрагмент не может быть помечен обнаруживаемой меткой, но может стать обнаруживаемым после реакции с еще одним фрагментом. Использование «помеченные обнаруживаемым образом» предназначено для включения последнего типа обнаруживаемого мечения.

[336] Согласно некоторым вариантам осуществления аффинность связывания антитела или его антигенсвязывающей части с антигеном (например, белковым

комплексом), таким как комплексы презентирующая молекула-proTGFβ1, определяют с помощью анализа Octet. Согласно некоторым вариантам осуществления анализ Octet представляет собой анализ, который определяет один или несколько кинетических параметров, указывающих на связывание между антителом и антигеном. Согласно некоторым вариантам осуществления система Octet® (ForteBio, Menlo Park, CA) используется для определения аффинности связывания антитела или его антигенсвязывающей части с комплексами презентирующая молекула-proTGFβ1. Например, аффинности связывания антител можно определить с использованием системы анализа fortéBio Octet QKe dip and read label free с использованием интерферометрии биослоя. Согласно некоторым вариантам осуществления антигены иммобилизованы на биосенсорах (например, биосенсорах, покрытых стрептавидином), а антитела и комплексы (например, комплексы биотинилированная презентирующая молекула-proTGFβ1) представлены в растворе в высокой концентрации (50 мкг/мл) для измерения взаимодействий связывания. Согласно некоторым вариантам осуществления аффинность связывания антитела или его антигенсвязывающей части с комплексом презентирующая молекула-proTGFβ1 определяется с использованием протокола, описанного в настоящем документе.

Характеристика новых, высокоаффинных, контекстно-независимых антител к proTGFβ1

Профили связывания

[337] Раскрытые в настоящем документе антитела обладают повышенной связывающей активностью. Предусмотрен класс высокоаффинных, контекстно-независимых антител, способных селективно ингибировать активацию TGFβ1. Следует отметить, что термин «*контекстно-независимый*» используется в настоящем документе с большей степенью строгости по сравнению с предыдущим более общим использованием. Согласно настоящему раскрытию термин придает уровень *однородности* относительных аффинностей (т.е. отсутствие смещения), который антитело может проявлять по отношению к различным антигенным комплексам. Таким образом, контекстно-независимое антитело согласно настоящему изобретению способно нацеливаться на несколько типов комплексов-предшественников TGFβ1 (например, комплексы презентирующая молекула-proTGFβ1) и связываться с каждым таким комплексом с эквивалентными аффинностями (т.е. с различиями не более чем в три раза в относительных аффинностях по отношению к различным комплексам) со значениями K_D ниже 10 нМ, предпочтительно ниже 5 нМ, более предпочтительно ниже 1 нМ, еще более

предпочтительно ниже 100 пМ, как измерено, например, с помощью MSD-SET. Как представлено ниже, многие антитела, охватываемые настоящим изобретением, имеют значения K_D в субнаномолярном диапазоне.

[338] Таким образом, антитела способны специфически связываться с каждым из комплексов презентирующая молекула-proTGFβ1 человека (иногда называемого «большой комплекс латентности, который представляет собой тройной комплекс, состоящий из димера proTGFβ1, соединенного с единственной презентирующей молекулой), а именно LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1. Как правило, рекомбинантно полученные очищенные белковые комплексы используют в качестве антигенов (например, антигенные комплексы) для оценки или подтверждения способности антитела связывать антигенные комплексы в подходящих анализах связывания in vitro. Такие анализы хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя без ограничения анализы на основе биослойной интерферометрии (BLI) (такие как Octet®) и анализы на основе титрования равновесного раствора (такие как MSD-SET).

[339] Анализы связывания на основе BLI широко используются в настоящей области техники для измерения аффинности и кинетики антител к антигенам. Это безмаркерная технология, в которой биомолекулярные взаимодействия анализируются на основе оптических помех. Один из белков, например, тестируемое антитело, может быть иммобилизован на наконечнике биосенсора. Когда другой белок в растворе, например антиген, связывается с иммобилизованным антителом, это вызывает сдвиг в картине интерференции, которую можно измерить в режиме реального времени. Это позволяет отслеживать специфичность связывания, скорости ассоциации и диссоциации, а также зависимость от концентрации. Таким образом, BLI представляет собой *кинетическую* меру, которая показывает динамику системы. Благодаря простоте использования и быстроте получения результатов, анализы на основе BLI, такие как система Octet® (доступная от ForteBio/Molecular Devices, Фремонт, Калифорния), особенно удобны при использовании в качестве способа начального скрининга для выявления и разделения пула «связующие» от пула «не связующих» или «слабых связующих» в процессе скрининга.

[340] Анализы связывания на основе BLI показали, что новые антитела характеризуются как «контекстно-сбалансированные/контекстно-независимые» антитела, когда аффинность связывания измеряется с помощью Octet®. Как можно увидеть в таблице 8, обобщающей профили связывания на основе BLI неограничивающих примеров антител, эти антитела показывают относительно однородные значения KD в субнаномолярном диапазоне для четырех целевых комплексов с относительно низкими различиями между матриксом и клетками (не более пятикратного смещения) (см. столбец (H)). Это можно

сравнить с ранее идентифицированным антителом Ab3, представленным в качестве эталонного антитела, которое показывает значительно более высокие относительные аффинности к ассоциированным с матриксом комплексам (смещение в 27+ раз) по сравнению с ассоциированными с клетками комплексами.

[341] В таблице 8 ниже представлены неограничивающие примеры высокоаффинных, контекстно-независимых антител к proTGFβ1, охватываемых настоящим изобретением. В таблице представлены репрезентативные результаты анализов связывания in vitro, измеренные с помощью Octet®. Аналогичные результаты были получены с помощью метода на основе SPR (Biacore System).

[342] В столбце (A) таблицы перечислены моноклональные антитела с отдельными аминокислотными последовательностями. Ab3 (выделено жирным шрифтом) представляет собой ранее идентифицированное эталонное антитело, которое, как было показано, является сильнодействующим в анализах на основе клеток; эффективно на различных моделях животных; и с чистым токсикологическим профилем (раскрыто в: PCT/US2018/012601). В столбцах (B), (D), (E) и (F) указаны аффинности каждого из перечисленных антител, измеренные в K_D. Колонка (B) показывает аффинность к рекомбинантному комплексу человеческого LTBP1-proTGFβ1; столбец (C) показывает аффинность к комплексу рекомбинантного человеческого LTBP3-proTGFβ1; (E) показывает аффинность к комплексу рекомбинантного человеческого GARP-proTGFβ1; и (F) показывает аффинность к комплексу рекомбинантного человеческого LRRC33-proTGFβ1 каждого из антител. Средние значения K_D (B) и (C) показаны в соответствующем столбце (D), который в совокупности представляет аффинности антител к ассоциированным с ECM или матриксом комплексам proTGFβ1. Аналогичным образом, средние значения K_D (E) и (F) показаны в соответствующем столбце (G), который в совокупности представляет аффинности антител к комплексам proTGFβ1 клеточной поверхности или ассоциированным с клеткой. Наконец, относительные соотношения между средними значениями K_D из столбцов (D) и (G) выражаются как «кратность смещения» в столбце (H). Таким образом, чем больше номер столбца (H), тем большее смещение существует для конкретного антитела при сравнении предпочтений связывания антитела для ассоциированных с матриксом комплексов и комплексов клеточной поверхности. Это один из способов количественного представления и сравнения присущего антителам смещения по отношению к их целевым комплексам. Такие анализы могут быть применимы для руководства процессом выбора антитела-кандидата для конкретного терапевтического применения.

Таблица 8. Неограничивающие примеры контекстно-независимых антител к TGFβ1 и значений K_D, измеренных с помощью BLI

(A) Эталон. Ab	Ассоциированный с матриксом proTGFb1			Ассоциированный с клеткой proTGFb1			(H) G/D (разы смещен.)
	(B) hLTBP1	(C) hLTBP3	(D) ECM средн. (нМ)	(E) hGARP	(F) hLRRC33	(G) Клеточн. средн. (нМ)	
Ab3	**4,70E-10**	**4,59E-10**	**0,4645**	**1,73E-08**	**8,52E-09**	**12,91**	**27,79**
Ab21	2,25E-10	2,68E-10	0,2465	8,33E-10	4,55E-10	0,644	2,613
Ab22	3,18E-10	3,29E-10	0,3235	9,74E-10	4,15E-10	0,6945	2,147
Ab23	4,17E-10	4,68E-10	0,4425	1,34E-09	4,55E-10	0,8975	2,028
Ab24	2,46E-10	1,98E-10	0,222	6,65E-10	4,10E-10	0,5375	2,421
Ab25	2,17E-10	1,52E-10	0,1845	4,88E-10	4,09E-10	0,4485	2,431
Ab26	2,21E-10	1,73E-10	0,197	6,25E-10	3,60E-10	0,4925	2,500
Ab27	1,78E-10	2,38E-10	0,208	4,24E-10	2,99E-10	0,3615	1,738
Ab28	3,40E-10	3,16E-10	0,328	7,97E-10	4,09E-10	0,603	1,838
Ab29	1,89E-10	1,21E-10	0,155	3,07E-10	3,02E-10	0,3045	1,965
AB30	3,32E-10	2,61E-10	0,2965	8,33E-10	5,35E-10	0,684	2,307
Ab31	2,36E-10	1,81E-10	0,2085	5,81E-10	4,10E-10	0,4955	2,376
Ab6	2,07E-10	1,23E-10	0,165	4,04E-10	3,36E-10	0,37	2,242
Ab32	2,69E-10	2,15E-10	0,242	4,96E-10	6,98E-10	0,597	2,467
Ab33	1,79E-10	1,11E-10	0,145	2,65E-10	3,39E-10	0,302	2,083

[343] В настоящем изобретении предложен класс высокоаффинных, контекстно-независимых антител, каждое из которых способно связываться с эквивалентными аффинностями с каждым из четырех известных комплексов презентирующая молекула-proTGFβ1, а именно LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает каждый из комплексов презентирующая молекула-proTGFβ1 с эквивалентной или более высокой аффинностью по сравнению с ранее описанным эталонным антителом, Ab3. Согласно настоящему изобретению такое антитело специфически связывает каждый из вышеупомянутых комплексов с аффинностью (определяемой с помощью K_D), составляющей ≤ 5 нМ, как измерено с помощью подходящего анализа связывания in vitro, таким как биослойная интерферометрия и поверхностный плазмонный резонанс. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывается с комплексом

человеческого LTBP1-proTGFβ1 с аффинностью, составляющей ≤ 5 нМ, ≤ 4 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ, ≤ 5 нМ или ≤ 0,5 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывается с комплексом человеческого LTBP3-proTGFβ1 с аффинностью, составляющей ≤ 5 нМ, ≤ 4 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ, ≤ 5 нМ или ≤ 0,5 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывается с комплексом человеческого GARP-proTGFβ1 с аффинностью, составляющей ≤ 5 нМ, ≤ 4 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ, ≤ 5 нМ или ≤ 0,5 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывается с комплексом человеческого LRRC33-proTGFβ1 с аффинностью, составляющей ≤ 5 нМ, ≤ 4 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ или ≤ 0,5 нМ.

[344] Согласно предпочтительным вариантам осуществления такие антитела обладают перекрестной реактивностью в отношении человека и мыши. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывает комплекс мышиного LTBP1-proTGFβ1 с аффинностью ≤ 5 нМ, ≤ 4 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ, ≤ 5 нМ или ≤ 0,5 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывается с комплексом мышиного LTBP3-proTGFβ1 с аффинностью ≤ 5 нМ, ≤ 4 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ или ≤ 0,5 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывается с комплексом мышиного GARP-proTGFβ1 с аффинностью ≤ 5 нМ, ≤ 4 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ или ≤ 0,5 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент связывается с комплексом мышиного LRRC33-proTGFβ1 с аффинностью ≤ 5 нМ, ≤ 4 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ или ≤ 0,5 нМ.

[345] Как показано, антитела к proTGFβ1 согласно настоящему изобретению обладают особенно высокими аффинностями к ассоциированным с матриксом комплексам proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления среднее значение K_D ассоциированных с матриксом комплексов (т.е. LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ1) составляет ≤ 1 нМ или ≤ 0,5 нМ.

[346] Как показано, антитела к proTGFβ1 согласно настоящему изобретению обладают высокими аффинностями к ассоциированным с клеткой комплексам proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления среднее значение K_D ассоциированных с клеткой комплексов (т.е. GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1) составляет ≤ 2 нМ или ≤ 1 нМ.

[347] Высокоаффинные антитела к proTGFβ1 согласно настоящему изобретению характеризуются их однородными (несмещенными) аффинностями ко всем четырем антигенным комплексам (сравните, например, с Ab3). Ни один антигенный комплекс среди четырех известных комплексов презентирующая молекула-proTGFβ1, описанных в настоящем документе, существенно не отличается по K_D. Другими словами, в соответствии

с настоящим раскрытием были достигнуты более однородные связывающие активности по сравнению с ранее описанными антителами к proTGFβ1 (включая в себя Ab3) в том смысле, что каждое такое антитело проявляет эквивалентные аффинности ко всем четырем антигенным комплексам. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент демонстрируют несмещенные или однородные профили связывания, характеризующиеся тем, что разница (или диапазон) аффинностей антитела или фрагментов в четырех антигенных комплексах proTGFβ1 составляет не более чем в пять раз между самым низким и самым высоким значениями K_D. Согласно некоторым вариантам осуществления относительная разница (или диапазон) аффинностей составляет не более трех раз.

[348] Концепция «однородности» или отсутствия смещения дополнительно проиллюстрирована в таблице 8. Рассчитываются средние значения K_D между двумя ассоциированными с матриксом и ассоциированными с клетками комплексами, соответственно (см. столбцы (D) и (G)). Эти средние значения K_D затем можно использовать, чтобы спросить, существует ли смещение в активностях связывания между комплексами, ассоциированными с матриксом, по сравнению с комплексами, ассоциированными с поверхностью клетки (например, иммунными клетками). Смещение может быть выражено как «кратность разницы» в средних значениях K_D, как показано в таблице 8. По сравнению с ранее описанным антителом, Ab3, высокоаффинные, контекстно-независимые антитела к proTGFβ1, охватываемые настоящим раскрытием, являются значительно несмещенными, многие из них демонстрируют не более чем трехкратную разницу в средних значениях K_D между ассоциированными с матриксом и ассоциированными с клеткой комплексами (сравните это с 25+-кратным смещением у Ab3).

[349] Соответственно, предусмотрен класс контекстно-независимых моноклональных антител или фрагментов, каждое из которых способно связываться с эквивалентными аффинностями с каждым из следующих комплексов презенирующая молекула-proTGFβ1 с аффинностью $\leq$ 1 нМ, как измерено с помощью биослойной интерферометрии или поверхностного плазмонного резонанса: LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1. Такое антитело специфически связывает каждый из вышеупомянутых комплексов с аффинностью $\leq$ 5 нМ, как измерено биослойной интерферометрией или поверхностным плазмонным резонансом, где моноклональное антитело или фрагмент демонстрирует не более чем трехкратное смещение в аффинности по отношению к любому из вышеперечисленных комплексов относительно других комплексов, и где моноклональное антитело или фрагмент ингибирует высвобождение

зрелого фактора роста TGFβ1 из каждого из комплексов proTGFβ1, но не из комплексов proTGFβ2 или proTGFβ3.

[350] Хотя кинетика профилей связывания (например, скорости ассоциации и диссоциации), получаемых с помощью анализов на основе BLI, дает полезную информацию, заявитель настоящего раскрытия предположил, что на основе механизма действия активации раскрытых в настоящем документе ингибиторов, т.е. антител, которые работают путем связывания с привязанной (например, локализованной в ткани) неактивной (например, латентной) мишенью, тем самым предотвращая ее активацию, связывающие свойства, измеренные *в состоянии равновесия*, могут более точно отражать их поведение и эффективность in vivo. Чтобы представить это в перспективе, например, антитела с быстрой скоростью ассоциации (Kon), которая будет отражена в измерениях связывания, полученных с помощью BLI, могут предоставить соответствующие параметры для оценки *нейтрализующих* антител (например, антитела, которые непосредственно нацелены и должны быстро подвергать секвестрации сам активный растворимый фактор роста, чтобы они действовали как эффективные ингибиторы). Однако то же самое может не обязательно относиться к антителам, которые действуют как *ингибиторы активации*, такие как те, что раскрыты в настоящем документе. Как описано, механизм действия новых ингибиторов TGFβ1 согласно настоящему изобретению заключается в ингибировании стадии активации, которая достигается за счет воздействия на латентный комплекс, связанный с тканью/клеткой, в отличие от секвестрации растворимого постактивационного фактора роста. Это связано с тем, что *ингибитор активации* TGFβ1 нацелен на неактивный предшественник, локализованный в соответствующих тканях (например, внутри ECM, на поверхности иммунных клеток и т.д.), тем самым предупреждая высвобождение зрелого фактора роста из комплекса. Считается, что этот механизм действия позволяет ингибитору достигать целевого насыщения (например, равновесия) in vivo, без необходимости быстрой конкуренции за молекулы временного фактора роста с эндогенными рецепторами, как того требуют традиционные нейтрализующие ингибиторы.

[351] Принимая во внимание это различие в механизме действия, дальнейшая оценка связывающих свойств проводилась с использованием другого режима анализов связывания in vitro, который позволяет определять аффинность *в состоянии равновесия*.

[352] Ввиду этого предполагается, что анализы, которые измеряют аффинность связывания таких антител *в состоянии равновесия*, могут более точно отображать способ взаимодействия с мишенью in vivo. Таким образом, могут быть выполнены анализы связывания на основе MSD-SET (или другие подходящие анализы), как проиллюстрировано в таблице 9 ниже.

[353] Титрование равновесного раствора («SET») представляет собой анализ, с помощью которого можно измерить связывание двух молекул (например, антигена и антитела, связывающего антиген) в состоянии равновесия в растворе. Например, SET на основе Meso-Scale Discovery (MSD), или MSD-SET, является применимым способом определения констант диссоциации для особенно высокоаффинных белок-белковых взаимодействий в состоянии равновесия (см., например: Ducata et al. (2015) J Biomolecular Screening 20(10): 1256-1267). Анализы на основе SET особенно применимы для определения значений KD антител с субнаномолярными (например, пикомолярными) аффинностями.

Таблица 9. Неограничивающие примеры высокоаффинных контекстно-независимых антител к TGFβ1 (hIgG4) и значений K_D, измеренных с помощью MSD-SET («h» обозначает комплекс человека)

(A) Эталон. Ab	Ассоциированный с матриксом proTGFβ1			Ассоциированный с клеткой proTGFβ1			(H) G/D (разы смещен.)
	(B) hLTBP1	(C) hLTBP3	(D) ECM средн. (нМ)	(E) hGARP	(F) hLRRC33	(G) Клеточн. средн. (нМ)	
C1	3,30E-08	1,40E-08	23,2	5,10E-09	2,20E-09	3,65	0,16
C2	2,10E-08	1,20E-08	16,5	8,80E-09	6,10E-09	7,45	0,48
Ab3	1,30E-08	1,62E-08	14,6	2,80E-08	3,50E-08	31,5	2,16
Ab6	1,8E-11	2,9E-11	0,024	2,7E-11	6,3E-11	0,045	1,88
Ab22	5,00E-11	3,30E-11	0,042	2,70E-11	2,00E-10	0,114	2,71
Ab24	2,40E-11	2,10E-11	0,023	1,90E-11	1,80E-10	0,100	4,35
AB26	2,80E-11	2,30E-11	0,026	1,40E-11	1,30E-10	0,072	2,77
Ab29	1,20E-11	1,10E-11	0,012	5,50E-12	4,30E-11	0,024	2,00
Ab30	3,10E-11	2,60E-11	0,029	2,20E-11	1,40E-10	0,081	2,80
Ab31	1,90E-11	1,40E-11	0,017	1,90E-11	9,60E-11	0,058	3,41
Ab32	3,70E-11	2,60E-11	0,032	1,50E-11	8,70E-11	0,051	1,60
Ab33	1,10E-11	7,00E-12	0,009	7,80E-12	4,60E-11	0,027	3,00
Ab4	4,6E-9	5,5E-9	5,05	2,5E-9	2,1E-9	2,3	0,42

[354] Таблица 9 также включает в себя три ранее описанных TGFβ1-селективных антитела (C1, C2 и Ab3) в качестве эталонных антител. C1 и C2 впервые были описаны в

PCT/US2017/021972, опубликованной как WO 2017/156500, а Ab3 был описан в PCT/US2018/012601, опубликованной как WO 2018/129329.

[355] Как видно из данных по аффинности, представленных в таблице 9, связывающие активности новых антител согласно настоящему раскрытию значительно выше, чем у ранее идентифицированных эталонных антител. Более того, новые антитела к TGFβ1 являются «контекстно-независимыми» в том смысле, что они связываются с каждым из комплексов LLC человека с эквивалентными аффинностями (например, ~ субнаномолярный диапазон, например, с KD <1 нМ). Высокоаффинные, контекстно-независимые профили связывания позволяют предположить, что эти антитела могут быть полезными для использования при лечении связанных с TGFβ1 показаний, которые характеризуются дисрегуляцией как связанного с ECM, так и иммунного компонентов, таких как рак.

[356] Для анализов связывания на основе титрования равновесного раствора белковые комплексы, которые содержат одну из презентирующих молекул, таких как показанные выше, могут быть использованы в качестве антигена (комплекс презентирующая молекула-TGFβ1, или LLC). Тестируемые антитела могут образовывать комплекс антиген-антитело в растворе. Реакционные смеси антиген-антитело инкубируют до достижения равновесия; количество комплекса антиген-антитело, присутствующего в реакциях анализа, можно измерить подходящими способами, хорошо известными в настоящей области техники. По сравнению с анализами на основе BLI, анализы на основе SET в меньшей степени зависят от скорости ассоциации/диссоциации комплекса антиген-антитело, что позволяет проводить чувствительное обнаружение взаимодействия с очень высокой аффинностью. Как показано в таблице 9, в настоящем раскрытии предпочтительные высокоаффинные ингибиторы TGFβ1 демонстрируют субнаномолярный (например, пикомолярный) диапазон аффинностей для всех тестируемых больших латентных комплексов, как определено анализами на основе SET.

[357] Соответственно, предусмотрен класс контекстно-независимых моноклональных антител или фрагментов, каждое из которых способно связываться с эквивалентными аффинностями с каждым из следующих комплексов презентирующая молекула -proTGFβ1 человека с KD ≤ 1 нМ, как измерено с помощью анализа титрования равновесного раствора, такого как MSD-SET: hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1. Такое антитело специфически связывает каждый из вышеупомянутых комплексов с KD ≤ 1 нМ, как измерено с помощью MSD-SET, и где моноклональное антитело или фрагмент ингибирует высвобождение зрелого фактора роста TGFβ1 из каждого из комплексов proTGFβ1, но не из комплексов proTGFβ2 или proTGFβ3.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления такое антитело или фрагмент связывает каждый из вышеупомянутых комплексов с KD, составляющей 500п или меньше (т.е. ≤ 500 пМ), 250 пМ или меньше (т.е. ≤ 250 пМ) или 200 пМ или меньше (т.е. ≤ 200 пМ). Даже более предпочтительно такое антитело или фрагмент связывает каждый из вышеупомянутых комплексов с KD, составляющей 100 пМ или меньше (т.е. ≤ 100 пМ). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент не связывается со свободным фактором роста TGFβ1, который не связан с комплексом продомена. Это можно проверить или подтвердить с помощью подходящих анализов связывания in vitro, известных в настоящей области техники, таких как биослойная интерферометрия.

[358] Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления такие антитела или фрагменты также обладают перекрестной реактивностью с аналогами мышей (например, крысы и/или мыши) и/или не относящихся к человеку приматов (например, яванского макака). Приведем лишь один пример: Ab6 способен связываться с высокой аффинностью с каждым из больших латентных комплексов многих видов, включая в себя человека, мышь, крысу и яванского макака, как проиллюстрировано в таблице 10 и примере 9 ниже.

Таблица 10. Неограничивающий пример высокоаффинного контекстно-независимого антитела TGFβ1 с межвидовыми перекрестными реактивностями, измеренными с помощью MSD-SET («h» обозначает человека; «m» обозначает мышь)

Комплекс Ag	hLTBP1-proTGFβ1	hLTBP3-proTGFβ1	hGARP-proTGFβ1	hLRRC33-proTGFβ1	mLTBP1-proTGFβ1	mLTBP3-proTGFβ1	mGARP-proTGFβ1	mLRRC33-proTGFβ1
Ab6	1,80E-11	2,90E-11	2,70E-11	6,30E-11	2,40E-11	2,80E-11	2,10E-11	4,80E-11

Эффективность

[359] Раскрытые в настоящем документе антитела можно в широком смысле охарактеризовать как «функциональные антитела» за их способность ингибировать передачу сигнала TGFβ1. Используемый в настоящем документе термин «функциональное антитело» обеспечивает одну или несколько биологических активностей в силу своей способности связывать целевой белок (например, антиген) таким образом, чтобы модулировать его функцию. Таким образом, функциональные антитела в широком смысле включают в себя антитела, способные модулировать активность/функцию молекул-мишеней (т.е. антигена). Такие модулирующие антитела включают в себя *ингибирующие* антитела и *активирующие* антитела. Настоящее раскрытие относится к антителам, которые

могут ингибировать биологический процесс, опосредованный передачей сигналов TGFβ1, связанной с множественными контекстами TGFβ1. Подразумевается, что ингибирующие средства, используемые для осуществления настоящего изобретения, такие как антитела, описанные в настоящем документе, являются TGFβ1-селективными и не нацелены или не затрагивают TGFβ2 и TGFβ3 при введении в терапевтически эффективной дозе (доза, при которой достаточная эффективность достигается в пределах допустимых уровней токсичности). Новые антитела согласно настоящему раскрытию обладают повышенными ингибирующими активностями (эффективностью) по сравнению с ранее идентифицированными ингибиторами активации TGFβ1.

[360] Согласно некоторым вариантам осуществления эффективность ингибирующего антитела может быть измерена с помощью подходящих клеточных анализов, таких как анализы репортерных клеток CAGA, как описано в настоящем документе. Как правило, культивируемые клетки, такие как гетерологичные клетки и первичные клетки, можно использовать для проведения клеточных анализов эффективности. Можно использовать клетки, которые экспрессируют эндогенный TGFβ1 и/или представляющую интерес презентирующую молекулу, такую как LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33. Альтернативно, экзогенные нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющий интерес белок(белки), такой как TGFβ1, и/или представляющую интерес презентирующую молекулу, такую как LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33, могут быть введены в такие клетки для экспрессии, например, путем трансфекции (например, стабильной трансфекции или транзиентной трансфекции) или инфицированием на основе вирусного вектора. Согласно некоторым вариантам осуществления для таких анализов используют клетки LN229. Клетки, экспрессирующие TGFβ1 и представляющую интерес презентирующую молекулу (например, LTBP1, LTBP3, GARP или LRRC33), выращивают в культуре, которая «презентирует» большой латентный комплекс либо на поверхности клетки (когда он связан с GARP или LRRC33), либо депонирует в ECM (когда связан с LTBP). Активация TGFβ1 может запускаться интегрином, экспрессируемым на другой клеточной поверхности. Клетки, экспрессирующие интегрин, могут быть одними и теми же клетками, коэкспрессирующими большой латентный комплекс, или клетками отдельного типа. Репортерные клетки добавляются в систему анализа, которая включает в себя TGFβ-чувствительный элемент. Таким образом, степень активации TGFβ может быть измерена путем обнаружения сигнала от репортерных клеток (например, TGFβ-чувствительных репортерных генов, таких как люцифераза, связанная с TGFβ-чувствительным промоторным элементом) при активации TGFβ. Используя такие системы анализа на основе клеток, ингибирующие активности антител могут быть определены путем

измерения изменения (снижения) или разницы в репортерном сигнале (например, активностях люциферазы, измеренных с помощью считывания флуоресценции) либо в присутствии, либо при отсутствии тестируемых антител. Примеры таких анализов приведены в примере 2 в настоящем документе.

[361] Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая эффективность (IC_{50}) новых антител согласно настоящему раскрытию, рассчитанная на основе клеточных репортерных анализов для измерения активации TGFβ1 (например, клеточных анализов LN229, описанных в другом месте в настоящем документе), может составлять 5 нМ или меньше, при измерении по отношению к каждому из комплексов hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела характеризуются IC_{50}, составляющей 2 нМ или меньше (т.е. $\leq$ 2 нМ), измеренную в отношении каждого из LLC. Согласно предпочтительным вариантам осуществления IC_{50} антитела, измеренная в отношении каждого из комплексов LLC, составляет 1 нМ или меньше. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело характеризуются IC_{50}, составляющей менее 1 нМ в отношении каждого из комплексов hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1.

Таблица 11. Ингибирующие эффективности (в IC_{50}) выбранных антител, измеренные с помощью клеточных репортерных анализов

Эталонное Ab	**IC_{50} (нМ)**			
	hLTBP1-proTGFβ1	**hLTBP3-proTGFβ1**	**hGARP-proTGFβ1**	**hLRRC33-proTGFβ1**
Ab3	24,29	10,42	0,981	0,8578
Ab4	5,222	5,647	0,8221	3,499
Ab5	1,288	1,004	0,14	0,6158
Ab6	2,741	0,8214	0,324	0,4953
Ab21	1,607	0,7647	0,4005	0,5958
Ab23	0,8353	0,8788	0,2639	0,5793
Ab25	6,081	0,538	0,4418	0,6529
Ab26	0,7131	0,7164	0,2619	0,3406
Ab29	0,4711	0,803	0,2637	0,458
Ab33	1,56	1,112	0,1981	0,7383

[362] Активация TGFβ1 может запускаться интегрин-зависимым механизмом или протеазозависимым механизмом. Ингибирующие активности (например, эффективность) антител согласно настоящему раскрытию может быть оценена по способности блокировать активацию TGFβ1, индуцированную одним или обоими способами активации. Описанные выше клеточные репортерные анализы разработаны для измерения способности антител блокировать или ингибировать интегрин-зависимую активацию активации TGFβ1. Ингибирующая эффективность также может быть оценена путем измерения способности антител блокировать индуцированную протеазой активацию TGFβ1. В примере 3 настоящего раскрытия представлены неограничивающие варианты осуществления таких анализов. Результаты представлены на фиг. 5A и 5B. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения селективный в отношении изоформы ингибитор согласно настоящему раскрытию способен ингибировать интегрин-зависимую активацию TGFβ1 и протеазозависимую активацию TGFβ1. Такой ингибитор можно использовать для лечения показаний, связанных с TGFβ1, характеризующихся дисрегуляцией EDM, связанной с активностями протеаз. Например, такое показание, связанное с TGFβ1, может быть ассоциировано с повышенным количеством миофибробластов, повышенной жесткостью ECM, избыточным или аномальным отложением коллагена или любой их комбинацией. Такие состояния включают в себя, например, фиброзные нарушения и рак, включая в себя солидную опухоль (такую как метастатическая карцинома) или миелофиброз.

[363] Согласно некоторым вариантам осуществления эффективность может быть оценена на подходящих моделях in vivo как мера эффективности и/или фармакодинамических эффектов. Например, если первое антитело эффективно в модели in vivo при определенной концентрации, а второе антитело столь же эффективно при более низкой концентрации, чем первое в той же модели in vivo, тогда мне можно сказать, что второе антитело более эффективное, чем первое антитело. Любые подходящие модели заболевания, известные в настоящей области техники, можно использовать для оценки относительных эффективностей ингибиторов TGFβ1, в зависимости от конкретного представляющего интерес признака, например, моделей рака и моделей фиброза. Предпочтительно в такие исследования включают в себя несколько доз или концентраций каждого тестируемого антитела.

[364] Аналогичным образом, фармакодинамические (PD) эффекты могут быть измерены для определения относительной эффективности ингибирующих антител. Обычно используемые показатели PD для сигнального пути TGFβ включают в себя без ограничения фосфорилирование SMAD2/3 и экспрессию нижележащих эффекторных генов,

транскрипция которых чувствительна к активации TGFβ, например, с TGFβ-чувствительным промоторным элементом (например, Smad-связывающие элементы). Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему раскрытию способны полностью блокировать индуцированное заболеванием фосфорилирование SMAD2/3 в доклинических моделях фиброза, когда животным вводят дозу 3 мг/кг или меньше. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему раскрытию способны значительно подавлять индуцированную фиброзом экспрессию панели маркерных генов, включая в себя Acta2, Col1a1, Col3a1, Fn1, Itga11, Lox, Loxl2, когда животным вводят в дозе 10 мг/кг или меньше в модели фиброза почек UUO.

[365] Согласно некоторым вариантам осуществления процесс выбора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для терапевтического использования может поэтому включать в себя идентификацию антитела или фрагмента, которые проявляют достаточную ингибирующую эффективность. Например, процесс отбора может предусматривать стадию проведения клеточного анализа активации TGFβ1 для измерения эффективности (например, IC_{50}) одного или нескольких тестируемых антител или их фрагментов, а также выбор антитела-кандидата или его фрагмента, которое показывает требуемую эффективность. Согласно некоторым вариантам осуществления IC_{50} для каждого LLC человека составляет 5 нМ или меньше. Выбранное антитело или фрагмент затем можно использовать при лечении показаний, связанных с TGFβ1, описанных в настоящем документе.

Области связывания

[366] В контексте настоящего раскрытия «область(и) связывания» антигена обеспечивает структурную основу для взаимодействия антитело-антиген. Используемый в настоящем документе термин «область связывания» относится к областям границы взаимодействия между антителом и антигеном, так что при связывании с комплексом proTGFβ1 («антигеном») в физиологическом растворе антитело или фрагмент защищает связывающую область от воздействия растворителя, что определяется подходящими методами, такими как масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). Идентификация областей связывания применима для понимания взаимодействия антиген-антитело и механизма действия конкретного антитела. Идентификации дополнительных антител со сходными или перекрывающимися областями связывания могут способствовать эксперименты по перекрестному блокированию, которые позволяют сортировать эпитопы. Необязательно, рентгеновская кристаллография может быть использована для

идентификации точных аминокислотных остатков эпитопа, которые опосредуют взаимодействия антиген-антитело.

[367] Специалистам в настоящей области техники знакома HDX-MS, широко используемая техника для изучения конформации белков или белок-белковых взаимодействий в растворе. Этот способ основан на обмене водорода в амиде основной цепи белка на дейтерий, присутствующий в растворе. Измеряя скорости обмена водород-дейтерий, можно получить информацию о динамике и конформации белка (см. обзор: Wei et al. (2014) "Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics: methodology and applications." Drug Disco Today. 19(1): 95-102; включенный посредством ссылки). Применение этого метода основано на предпосылке, что при образовании комплекса антитело-антиген граница взаимодействия между партнерами связывания может блокировать растворитель, тем самым снижая или предотвращая скорость обмена из-за стерического исключения растворителя.

[368] Согласно настоящему раскрытию предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают LLC человека в области («область связывания»), содержащей лассо латентности или его часть. Лассо латентности представляет собой белковый модуль в пределах продомене. Предполагается, что многие сильные ингибиторы активации могут связываться с этой областью комплекса proTGFβ1 таким образом, что связывание антитела «запирает» фактор роста, тем самым предотвращая его высвобождение. Интересно, что это часть комплекса, где удлиненные области фактора роста, похожие на бабочку (например, соответствующие, например, Finger-1 и Finger-2), тесно взаимодействуют с похожей на клетку структурой продомена.

[369] Как изображено на фиг. 18B, лассо латентности включает в себя области, обозначенные как 2a и часть 2b, которые являются частью продомена. Обратите внимание, что непосредственно примыкает к лассо латентности область, обозначенная как 5a, соответствует так называемому Finger-1 в домене фактора роста, и область, обозначенная как 6b вокруг противоположной стороны, является частью Finger-2 в домене фактора роста. На основании этого нетрудно предположить, что антитело, которое плотно обвивается вокруг этих областей, могло бы эффективно предотвращать разъединение комплекса proTGFβ1, тем самым блокируя активацию.

[370] Используя метод HDX-MS, можно определить области связывания proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления часть proTGFβ1, идентифицированная как важная для связывания антитела или фрагмента, включает в себя по меньшей мере часть продомена и по меньшей мере часть домена фактора роста. Предпочтительны антитела или фрагменты, которые связывают первую область связывания («Область 1» на фиг. 19A),

содержащую по меньшей мере часть лассо латентности. Более предпочтительно, чтобы такие антитела или фрагменты дополнительно связывались со второй областью связывания («Область 2» на фиг. 19A), содержащей по меньшей мере часть домена фактора роста на Finger-1 домена фактора роста. Такие антитела или фрагменты могут дополнительно связываться с третьей областью связывания («Область 3» на фиг. 19A), содержащей по меньшей мере часть Finger-2 домена фактора роста.

[371] Дополнительные области в пределах proTGFβ1 также могут вносить, прямо или косвенно, вклад в высокоаффинное взаимодействие этих раскрытых в настоящем документе антител. Области, которые считаются важными для опосредования высокоаффинного связывания антитела с комплексом proTGFβ1 (см. фиг. 18A), могут включать в себя без ограничения: LVKRKRIEA (SEQ ID NO: 159); LASPPSQGEVP (SEQ ID NO: 160); PGPLPEAV (SEQ ID NO: 161); LALYNSTR (SEQ ID NO: 162); REAVPEPVL (SEQ ID NO: 163); YQKYSNNSWR (SEQ ID NO: 164); RKDLGWKWIHEPKGYHANF (SEQ ID NO: 165); LGPCPYIWS (SEQ ID NO: 166); ALEPLPIV (SEQ ID NO: 167); и VGRKPKVEQL (SEQ ID NO: 168) (на основе нативной последовательности proTGFβ1 человека).

[372] Среди областей, которые могут вносить вклад во взаимодействие антитело-антиген, согласно некоторым вариантам осуществления высокоаффинное антитело согласно настоящему раскрытию может связывать эпитоп, который содержит по меньшей мере один остаток аминокислотной последовательности KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL («Область 1») (SEQ ID NO: 169).

[373] Согласно некоторым вариантам осуществления высокоаффинное антитело согласно настоящему раскрытию может связывать эпитоп, который содержит по меньшей мере один остаток аминокислотной последовательности RKDLGWKWIHEPKGYHANF (“Область 2”) (SEQ ID NO: 165).

[374] Согласно некоторым вариантам осуществления высокоаффинное антитело согласно настоящему раскрытию может связывать эпитоп, который содержит по меньшей мере один остаток аминокислотной последовательности VGRKPKVEQL (“Область 3”) (SEQ ID NO: 168).

[375] Согласно некоторым вариантам осуществления высокоаффинное антитело согласно настоящему раскрытию может связывать эпитоп, который содержит по меньшей мере один остаток аминокислотной последовательности KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL (“Область 1”) (SEQ ID NO: 169) и по меньшей мере один остаток аминокислотной последовательности RKDLGWKWIHEPKGYHANF (“Область 2”) (SEQ ID NO: 165).

[376] Согласно некоторым вариантам осуществления высокоаффинное антитело согласно настоящему раскрытию может связывать эпитоп, который содержит по меньшей мере один остаток аминокислотной последовательности KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ("Область 1") (SEQ ID NO: 169) и по меньшей мере один остаток аминокислотной последовательности VGRKPKVEQL ("Область 3") (SEQ ID NO: 168).

[377] Согласно некоторым вариантам осуществления высокоаффинное антитело согласно настоящему раскрытию может связывать эпитоп, который содержит по меньшей мере один остаток аминокислотной последовательности KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL ("Область 1") (SEQ ID NO: 169), по меньшей мере один остаток аминокислотной последовательности RKDLGWKWIHEPKGYHANF ("Область 2") (SEQ ID NO: 165), и по меньшей мере один остаток аминокислотной последовательности VGRKPKVEQL ("Область 3") (SEQ ID NO: 168).

[378] Помимо вкладов из областей 1, 2 и/или 3, такой эпитоп может дополнительно включать в себя по меньшей мере один аминокислотный остаток из последовательности, выбранной из группы, состоящей из: LVKRKRIEA (SEQ ID NO: 159); LASPPSQGEVP (SEQ ID NO: 160); PGPLPEAV (SEQ ID NO: 161); LALYNSTR (SEQ ID NO: 162); REAVPEPVL (SEQ ID NO: 163); YQKYSNNSWR (SEQ ID NO: 164); RKDLGWKWIHEPKGYHANF (SEQ ID NO: 165); LGPCPYIWS (SEQ ID NO: 166); ALEPLPIV (SEQ ID NO: 167); и VGRKPKVEQL (SEQ ID NO: 168).

[379] Примечательно, что многие из областей связывания, идентифицированные в структурных исследованиях с использованием четырех репрезентативных селективных в отношении изоформы антител к TGFβ1, перекрываются, указывая на определенные области в комплексе proTGFβ1, которые могут быть особенно важны для поддержания латентности комплекса proTGFβ1. Таким образом, преимущественно антитела или их фрагменты могут быть выбраны, по меньшей мере частично, на основе их области(ей) связывания, которая(ые) включает(ют) в себя перекрывающиеся части, идентифицированные для множества описанных в настоящем документе ингибиторов. Эти перекрывающиеся части областей связывания включают в себя, например, SPPSQGEVPPGPLPEAVL (SEQ ID NO: 201), WKWIHEPKGYHANF (SEQ ID NO: 202) и PGPLPEAVL (SEQ ID NO: 203). Таким образом, высокоаффинный, селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1 согласно настоящему раскрытию может связывать комплекс proTGFβ1 (например, LLC человека) с эпитопом, который содержит один или несколько аминокислотных остатков из SPPSQGEVPPGPLPEAVL (SEQ ID NO: 201), WKWIHEPKGYHANF (SEQ ID NO: 202) и/или PGPLPEAVL (SEQ ID NO: 203).

[380] Таким образом, любое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, охватываемые настоящим раскрытием, такие как антитела или фрагменты категорий 1-5, раскрытые в настоящем документе, могут связывать одну или несколько из идентифицированных в настоящем документе областей связывания. Такие антитела можно использовать для лечения связанного с TGFβ1 показания у субъекта, как описано в настоящем документе. Соответственно, выбор антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, подходящего для терапевтического использования в соответствии с настоящим раскрытием, может включать в себя идентификацию или выбор антитела или его фрагмента, которые связывают SPPSQGEVPPGPLPEAVL (SEQ ID NO: 201), WKWIHEPKGYHANF (SEQ ID NO: 202), PGPLPEAVL (SEQ ID NO: 203) или любую(ые) их часть(и).

[381] Неограничивающие примеры белковых доменов или мотивов proTGFβ1 человека, как описано ранее (WO 2014/182676), представлены в таблице 12.

Таблица 12. Выбранные белковые домены/мотивы полипептидов, родственных TGFβ1 человека

Домен/модуль TGFβ1 человека	**Аминокислотная последовательность**	**SEQ ID NO**
Ассоциированный с латентностью пептид (LAP) (продомен)	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVT RVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVL LSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLL APSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCD SRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPL ERAQHLQSSRHRR (*“Первая область связывания” подчеркнута*)	146
Straight Jacket	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLP (*“Лассо латентности” подчеркнуто*)	147
Домен фактора роста	ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGY HANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCC VPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS (*“Finger-1” и “Finger-2” подчеркнуты соответственно*)	148
«Застежка»	остатки 74-76, YYA	н/п
Сайт расщепления фурином	RHRR	149

Плечо (Arm)	EAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSR AELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPS DSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRD NTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERA QHLQSSRHRR	150
Finger-1	CVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFC (*"Вторая область связывания" подчеркнута*)	151
Finger-2	CVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS (*"Третья область связывания" подчеркнута*)	152
Остаток для ассоциации презентирующей молекулы	Cys 4	н/п
Лассо латентности	LASPPSQGEVPPGPL *(Часть областей связывания, общих для 4 различных селективных в отношении изоформы антител к proTGFβ1, подчеркнута)*	153
Увеличенное лассо латентности	LASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTR (*Часть областей связывания, общих для 4 различных селективных в отношении изоформы антител к proTGFβ1, подчеркнута)*	154
Спираль альфа-1	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLR	155
Спираль альфа-2	AVLALYNSTR	156
Петля Trigger Loop	NGFTTGRRGDLATIHGMNRP	157
Связывание интегрина	остаток 215-217, RGD	н/п
«Bowtie»	CSCDSRDNTLQVD	158

Безопасность/токсикология

[382] Известно, что общепринятые неселективные ингибиторы TGFβ, способные противодействовать множеству изоформ, вызывают ряд токсических эффектов, включая в себя, например, сердечно-сосудистую токсичность (поражения сердца, в первую очередь вальвулопатию), о которых сообщалось у нескольких видов животных, включая собак и крыс. К ним относятся гиперплазия аортального клапана, правого AV-клапана и левого AV-клапана; воспаление аортального клапана, левого AV-клапана и восходящей аорты;

кровоизлияние в восходящую аорту, аортальный клапан и левый AV-клапан; дегенерация соединительной ткани в восходящей аорте (см., например, Strauber et al. (2014) “Nonclinical safety evaluation of a Transforming Growth Factor β receptor I kinase inhibitor in Fischer 344 rats and beagle dogs” J. Clin. Pract 4(3): 1000196). См. также фиг. 21A.

[383] Кроме того, нейтрализующие антитела, которые связывают все три изоформы TGFβ, были ассоциированы с определенной эпителиальной токсичностью, наблюдаемой у нескольких видов, некоторые из которых обобщенно представлены ниже.

Таблица 13. Эпителиальная токсичность, ассоциированная с неселективными ингибиторами TGFβ

	Мыши	**Яванские макаки**	**Люди**
Токсичности	• Гиперплазия и воспаление языка, десен и пищевода. • Необратимые результаты (восстановление через 12 недель)	• Гиперплазия десен, носового эпителия и мочевого пузыря. • Анемия, приводящая к прекращению лечения • Изменения были обратимыми (кроме мочевого пузыря).	• Десневое кровотечение. • Носовое кровотечение • Головная боль • усталость • Различные кожные заболевания, включая кератоакантому (КА), гиперкератоз, кожную плоскоклеточную карциному (SCC) и базальноклеточную карциному.
Лекарственное средство/доза/ продолжительность	1D11 Дозировка: 50 мг/кг (3х/неделя) Продолжительность: 9-12 недель	GC1008 Дозировка: 10 и 50 мг/кг Продолжительность: 6 месяцев	GC1008 Доза: 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 15 мг/кг Продолжительность : 4 ежемесячных дозы
Воздействие	Конц. в сыворот. = 1-2 мг/мл (в течение 4-12 недель)	Не раскрыто	Время полужизни: 21,7 д DN Cmax ~(350 нг/мл)мг
*Vitsky et. Al. Am. J Pathology vol. 174, 2009; и Lonning et. al. Current Pharmaceutical Biotech, 2011			

[384] Основываясь на том, что заявитель настоящего раскрытия раннее установил (см. PCT/US2017/021972) тот факт, что отсутствие специфичности в отношении изоформ традиционных антагонистов TGFβ может лежать в основе источника токсичности, ассоциированной с ингибированием TGFβ, авторы настоящего изобретения стремились дополнительно достичь ингибирования TGFβ1 широкого спектра действия для лечения

различных заболеваний, которые проявляют многогранную дисрегуляцию TGFβ1, при сохранении аспекта безопасности/переносимости селективных в отношении изоформы ингибиторов.

[385] В клинических условиях терапевтический эффект достигается только тогда, когда минимальные эффективные концентрации (MEC) лекарственного средства (например, моноклонального антитела) ниже минимальных токсических концентраций (MTC) лекарственного средства. Этого не удалось достичь с большинством, если не всеми, общепринятыми неселективными ингибиторами TGFβ, которые, по-видимому, вызывают ограничивающую дозу токсичность. В предыдущей работе настоящего заявителя были описаны селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, которые показали заметно улучшенный профиль безопасности по сравнению с общепринятыми неселективными ингибиторами, такими как антагонисты низкомолекулярных рецепторов и нейтрализующие антитела. В WO 2017/156500 раскрыт селективный в отношении изоформы ингибитор активации TGFβ1, который при введении крысам в дозе до 100 мг/кг в неделю в течение 4 недель не проявлял токсичности, связанной с исследуемым препаратом, что устанавливает NOAEL для антитела в качестве наивысшей испытанной дозы, т.е. 100 мг/кг. Последующая работа настоящего заявителя также показала, что антитело с улучшенной функцией также показало эквивалентные профили безопасности. В настоящем документе одна из целей заключалась в том, чтобы идентифицировать антитела с еще более высокими аффинностями и эффективностями, но по меньшей мере с таким же или эквивалентным уровнем безопасности.

[386] Результаты четырехнедельных токсикологических исследований на крысах представлены на фиг. 21B и 21C. Два селективных в отношении изоформы ингибитора TGFβ1 (Ab3 и Ab6) были протестированы в отдельных исследованиях вместе с низкомолекулярным ингибитором ALK5 и моноклональным нейтрализующим антителом в качестве контроля. Никакой токсичности, связанной с исследуемым препаратом, не было отмечено ни с одним из селективных в отношении изоформы антител, в то время как неселективные ингибиторы, как и ожидалось, вызвали ряд нежелательных явлений, согласующихся с опубликованными исследованиями. Более того, было показано, что Ab6 безопасен (например, не наблюдается нежелательных явлений) на уровне дозы до 300 мг/кг у яванских макак при еженедельной дозировке в течение 4 недель. Поскольку на ряде моделей in vivo было показано, что Ab6 эффективен при такой низкой дозе, как 3 мг/кг, это дает вплоть до 100-кратное терапевтическое окно. Важно отметить, что это демонстрирует, что высокая эффективность не обязательно означает больший риск токсичности. Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, предполагается, что высокоселективная

природа раскрытых в настоящем документе антител, вероятно, объясняет отсутствие наблюдаемых токсичностей.

[387] Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления новое антитело согласно настоящему раскрытию имеет максимально переносимую дозу (MTD)> 100 мг/кг при еженедельной дозе в течение по меньшей мере 4 недель. Согласно некоторым вариантам осуществления новое антитело согласно настоящему раскрытию имеет уровень отсутствия наблюдаемых нежелательных эффектов (NOAEL) вплоть до 100 мг/кг при еженедельной дозировке в течение по меньшей мере 4 недель. Подходящие модели на животных для использования для проведения исследований безопасности/токсикологии для ингибиторов TGFβ и ингибиторов TGFβ1 включают в себя без ограничения крыс, собак, яванских макак и мышей. Согласно предпочтительным вариантам осуществления минимальное эффективное количество антитела, основанное на подходящем доклиническом исследовании эффективности, ниже NOAEL. Более предпочтительно минимальное эффективное количество антитела составляет приблизительно одну треть или менее от NOAEL. Согласно особенно предпочтительным вариантам осуществления минимальное эффективное количество антитела составляет приблизительно одну шестую или менее от NOAEL. Согласно некоторым вариантам осуществления минимальное эффективное количество антитела составляет приблизительно одну десятую или менее от NOAEL.

[388] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение охватывает селективное в отношении изоформы антитело, способное ингибировать передачу сигнала TGFβ1, которое при введении субъекту не вызывает сердечно-сосудистую или известную эпителиальную токсичность в дозе, эффективной для лечения показаний, связанных с TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело характеризуется минимальным эффективным количеством, составляющим приблизительно 3-10 мг/кг, вводимым еженедельно, раз в две недели или ежемесячно. Предпочтительно антитело не вызывает минимальной токсичности в дозе, которая по меньшей мере в шесть раз превышает минимальное эффективное количество (например, шестикратное терапевтическое окно). Более предпочтительно антитело не вызывает минимальной токсичности в дозе, которая по меньшей мере в десять раз превышает минимальное эффективное количество (например, десятикратное терапевтическое окно). Еще более предпочтительно антитело не вызывает минимальной токсичности в дозе, которая по меньшей мере в пятнадцать раз превышает минимальное эффективное количество (например, пятнадцатикратное терапевтическое окно).

[389] Таким образом, выбор антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для терапевтического использования может включать в себя: выбор антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которые соответствуют критериям одной или нескольких категорий 1-5, описанных в настоящем документе; проведение исследования эффективности in vivo на подходящей доклинической модели для определения эффективного количества антитела или фрагмента; проведение исследования безопасности/токсикологии in vivo на подходящей модели для определения количества антитела, которое является безопасным или токсичным (например, MTD, NOAEL или любые признанные в настоящей области техники параметры для оценки безопасности/токсичности); и выбор антитела или фрагмента, которые обеспечивают по меньшей мере трехкратное терапевтическое окно (предпочтительно 6-кратное, более предпочтительно 10-кратное терапевтическое окно, еще более предпочтительно 15-кратное терапевтическое окно). Согласно предпочтительным вариантам осуществления исследование эффективности in vivo проводят на двух или более подходящих доклинических моделях, которые воспроизводят состояния человека. Согласно некоторым вариантам осуществления такие доклинические модели включают TGFβ1-положительный рак, который необязательно может включать в себя иммуносупрессивную опухоль. Иммуносупрессивная опухоль может быть устойчивой к терапии рака, такой как СВТ, химиотерапия и лучевая терапия. Согласно некоторым вариантам осуществления доклинические модели выбраны из моделей опухолей MBT-2, Cloudman S91 и EMT6.

[390] Выбранное антитело или фрагмент можно использовать в производстве фармацевтической композиции, содержащей антитело или фрагмент. Такую фармацевтическую композицию можно использовать при лечении показания, связанного с TGFβ1, у субъекта, как описано в настоящем документе. Например, показанием, связанным с TGFβ1, может являться пролиферативное нарушение и/или фиброзное нарушение.

Механизм действия

[391] Антитела согласно настоящему изобретению, которые можно использовать в качестве терапевтических средств, представляют собой ингибирующие антитела к TGFβ1. Кроме того, антитела являются ингибиторами активации, т.е. антитела блокируют стадию активации TGFβ1, а не напрямую преследуют уже активированный фактор роста.

[392] В широком смысле термин «ингибирующее антитело» относится к антителу, которое противодействует или нейтрализует целевую функцию, например, активность фактора роста. Преимущественно предпочтительные ингибирующие антитела согласно настоящему раскрытию способны ингибировать высвобождение зрелого фактора роста из

латентного комплекса, тем самым снижая передачу сигнала фактора роста. Ингибирующие антитела включают в себя антитела, нацеленные на любой эпитоп, который снижает высвобождение или активность фактора роста, когда он ассоциирован с такими антителами. Такие эпитопы могут лежать на продоменах белков TGFβ (например, TGFβ1), факторах роста или других эпитопах, которые при связывании антителом приводят к снижению активности фактора роста. Ингибирующие антитела согласно настоящему изобретению включают в себя без ограничения антитела, ингибирующие TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующие антитела согласно настоящему раскрытию специфически связываются с комбинаторным эпитопом, т.е. эпитопом, образованным двумя или более компонентами/частями антигена или антигенного комплекса. Например, комбинаторный эпитоп может быть образован за счет вкладов нескольких частей одного белка, т.е. аминокислотных остатков из более чем одного несмежного сегмента одного и того же белка. Альтернативно, комбинаторный эпитоп может быть сформирован за счет вкладов множества белковых компонентов антигенного комплекса. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующие антитела согласно настоящему раскрытию специфически связывают конформационный эпитоп (или конформационно-специфический эпитоп), например, эпитоп, чувствительный к трехмерной структуре (т.е. конформации) антигена или антигенного комплекса.

[393] Традиционные подходы к противодействию передаче сигналов TGFβ заключались в: i) прямой нейтрализации зрелого фактора роста после того, как он уже стал активным, чтобы истощить свободные лиганды (например, высвобожденные из его латентного комплекса-предшественника), которые доступны для связывания с рецептором; ii) использовании растворимых фрагментов рецептора, способных секвестрировать свободные лиганды (например, так называемые ловушки лигандов); или iii) нацеливании на рецептор (рецепторы) клеточной поверхности для блокирования взаимодействий лиганд-рецептор. Каждый из этих традиционных подходов требует, чтобы антагонист конкурировал с эндогенными аналогами. Более того, первые два подхода (i и ii), указанные выше, нацелены на активный лиганд, который является временной формой. Следовательно, такой антагонист должен быть способен кинетически превосходить эндогенный рецептор в течение короткого временного окна. Третий подход может обеспечить более длительный эффект в сравнении, но непреднамеренно приводит к нежелательным ингибирующим эффектам (следовательно, возможной токсичности), поскольку многие факторы роста (например, вплоть до ~ 20) передают сигнал через один и тот же рецептор(ы).

[394] Для решения этих недостатков и для дальнейшего обеспечения большей селективности и локализованного действия предпочтительный механизм действия,

лежащий в основе ингибирующих антител, таких как описанные в настоящем документе, действует *выше* активации TGFβ1 и взаимодействия лиганд-рецептор. Таким образом, предполагается, что высокоаффинные, специфические в отношении изоформы, контекстно-независимые ингибиторы TGFβ1, подходящие для осуществления настоящего изобретения, должны предпочтительно нацеливаться на неактивный (например, латентный) комплекс TGFβ1-предшественник (например, комплекс, содержащий про/латентный TGFβ1) до его активации, чтобы заблокировать стадию активации в его источнике (например, в микроокружении заболевания, например, TME). Согласно предпочтительным вариантам осуществления настоящего изобретения такие ингибиторы нацелены с эквивалентными аффинностями как на ассоциированные с ECM, так и на привязанные к клеточной поверхности про/латентные комплексы TGFβ1, а не на свободные лиганды, которые временно доступны для связывания с рецептором.

[395] Преимущества локального нацеливания на комплекс, связанный с тканью/клеткой в источнике, по сравнению с растворимыми активными видами (т.е. зрелыми факторами роста после высвобождения из источника), дополнительно подтверждаются недавним исследованием. Ishihara et al. (Sci. Transl. Med. 11, eaau3259 (2019) “Targeted antibody and cytokine cancer immunotherapies through collagen affinity”) сообщили, что, когда системно вводимые лекарственные средства нацелены на участки опухоли путем конъюгирования с коллагенсвязывающим фрагментом, они могут усиливать противоопухолевый иммунитет и снижать токсичность, связанную с лечением, по сравнению с не нацеленными аналогами.

[396] Механизм действия, достигаемый с помощью антител согласно настоящему раскрытию, может дополнительно способствовать увеличению продолжительности эффекта, а также общей большей эффективности и безопасности.

[397] Интересно, что эти антитела могут проявлять дополнительные ингибирующие активности в отношении ассоциированного с клеткой TGFβ1 (LRRC33-proTGFβ1 и GARP-proTGFβ1). Заявитель настоящего изобретения обнаружил, что LRRC33-связывающие антитела имеют тенденцию интернализоваться при связывании с LRRC33 поверхности клетки. Неясно, активно ли интернализация индуцируется связыванием антител или, альтернативно, это явление является результатом естественной (например, пассивной) эндоцитарной активности макрофагов. Однако высокоаффинный, селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1, Ab6, способен быстро интернализоваться в клетках, трансфицированных LRRC33 и proTGFβ1, и скорость интернализации, достигаемая с помощью Ab6, значительно выше, чем с эталонным антителом, которое распознает LRRC33 клеточной поверхность (фиг. 6). Аналогичные результаты получены

для первичных макрофагов человека. Эти наблюдения повышают вероятность того, что Ab6 может индуцировать интернализацию при связывании со своей мишенью, LRRC33-proTGFβ1, тем самым удаляя LRRC33-содержащие комплексы с поверхности клетки. В очагах заболевания это может снизить доступность активируемых уровней латентных LRRC33-proTGFβ1. Следовательно, селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 могут ингибировать плечо LRRC33 в TGFβ1 посредством двух параллельных механизмов действия: i) блокирование высвобождения зрелого фактора роста из латентного комплекса; и ii) удаление комплексов LRRC33-proTGFβ1 с поверхности клетки посредством интернализации. Возможно, что аналогичные механизмы ингибирующего действия могут применяться к GARP-proTGFβ1.

[398] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой pH-чувствительное антитело, которое связывает свой антиген с более высокой аффинностью при нейтральном pH (таком как pH около 7), чем при кислом pH (таком как pH около 5). Такие антитела могут характеризоваться более высокими скоростями диссоциации в кислых условиях, чем в нейтральных или физиологических условиях. Например, соотношение между скоростями диссоциации, измеренными при кислом pH, и скоростями диссоциации, измеренными при нейтральном pH (например, K_{off} при pH 5 по сравнению с K_{off} при pH 7), может составлять по меньшей мере 1,2. Необязательно соотношение составляет по меньшей мере 1,5. Согласно некоторым вариантам осуществления соотношение составляет по меньшей мере 2. Такие чувствительные к pH антитела могут быть применимы в качестве рециклирующих антител. При взаимодействии с мишенью на поверхности клетки антитело может запускать зависимую от антитела интернализацию (следовательно, удаление) мембраносвязанных комплексов proTGFβ1 (ассоциированных с LRRC33 или GARP). Впоследствии в кислотном внутриклеточном компартменте, таком как лизосома, комплекс антитело-антиген диссоциирует, и свободное антитело может транспортироваться обратно во внеклеточный домен.

[399] Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления выбор антитела или антигенсвязывающего фрагмента для терапевтического использования может частично основываться на способности индуцировать зависимую от антитела интернализацию и/или зависимость от pH антитела.

Антигенные комплексы и их компоненты

[400] Новые антитела согласно настоящему раскрытию специфически связываются с каждым из четырех известных больших латентных комплексов человека (например, hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1),

селективно ингибируют активацию TGFβ1. Предпочтительные антитела также удовлетворяют критериям одной или нескольких категорий 1-5, приведенных в таблице 1.

[401] Скрининг (например, идентификация и отбор) таких антител предусматривает использование подходящих антигенных комплексов, которые, как правило, получают рекомбинантно. Предусмотрены применимые белковые компоненты, которые могут содержать такие антигенные комплексы, включая в себя изоформы TGFβ и родственные полипептиды, фрагменты и варианты, презентирующие молекулы (например, LTBP, GARP, LRRC33) и родственные полипептиды, фрагменты и варианты. Эти компоненты можно экспрессировать, очистить и дать им возможность образовать белковый комплекс (например, большие латентные комплексы), который можно использовать в процессе скрининга антител. Скрининг может включать в себя положительную селекцию, при которой желательные связывающие средства выбирают из пула или библиотеки связывающих и несвязывающих средств, и отрицательную селекцию, при которой нежелательные связывающие средства удаляются из пула. Как правило, по меньшей мере один ассоциированный с матриксом комплекс (например, LTBP1-proTGFβ1 и/или LTBP3-proTGFβ1) и по меньшей мере один ассоциированный с клеткой комплекс (например, GARP-proTGFβ1 и/или LRRC33-proTGFβ1) включены для положительного скрининга, чтобы гарантировать что выбранные связывающие средства обладают аффинностями к обоим таким биологическим контекстам.

[402] Согласно некоторым вариантам осуществления TGFβ1 содержит встречающуюся в природе аминокислотную последовательность млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления TGFβ1 содержит встречающуюся в природе аминокислотную последовательность человека. Согласно некоторым вариантам осуществления TGFβ1 содержит аминокислотную последовательность человека, обезьяны, крысы или мыши. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, не связываются специфически с TGFβ2. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, не связываются специфически с TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело, или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, не связываются специфически с TGFβ2 или TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, специфически связываются с TGFβ1, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34. Аминокислотные последовательности TGFβ2 и аминокислотная последовательность TGFβ3 представлены в SEQ ID NO: 38 и 32

соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления антител или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, специфически связываются с TGFβ1, содержащим не встречающуюся в природе аминокислотную последовательность (иначе называемую в настоящем документе как не встречающийся в природе TGFβ1). Например, не встречающийся в природе TGFβ1 может содержать одну или несколько рекомбинантно созданных мутаций по сравнению с встречающейся в природе аминокислотной последовательностью TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная последовательность TGFβ1, TGFβ2 или TGFβ3 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 24-35, как показано в таблице 14. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная последовательность TGFβ1, TGFβ2 или TGFβ3 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 36-43, как показано в таблице 15.

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

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

[405] TGFβ3 (продомен + домен фактора роста)
SLSLSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLE
EMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVE
KNRTNLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYIGGKNLPTRGTAEWL
SFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHG
RGDLGRLKKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPGQGGQRKKRALDTNYCFRNLEENCCVR

PLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPC CVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS (SEQ ID NO: 32)

Таблица 14. Иллюстративные аминокислотные последовательности TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3

Белок	Последовательность	SEQ ID NO
proTGFβ1	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQ VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAP CCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	24
proTGFβ1 C4S	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQ VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP KGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAP CCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	25
proTGFβ1 D2G	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQ VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPK GYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPC CVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	26
proTGFβ1 C4S D2G	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGP LPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVL MVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRA ELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSP EWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQ VDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSS RHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPK GYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPC CVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS	27
proTGFβ2	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPE EVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKE VYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASNL VKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYID SKVVKTRAEGEWLSFDVTDAVHEWLHHKDRNLGFKISLH CPCCTFVPSNNYIIPNKSEELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIK STRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAY CFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCA GACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPL TILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS	28

proTGFβ2 C5S	SLSTSSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEE VPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEV YKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASNLV KAEFRVFRLQNPKARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDS KVVKTRAEGEWLSFDVTDAVHEWLHHKDRNLGFKISLHC PCCTFVPSNNYIIPNKSEELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKS TRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRRKKRALDAAYC FRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAG ACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTI LYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS	29
proTGFβ2 C5S D2G	SLSTSSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPEE VPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKEV YKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASNLV KAEFRVFRLQNPKARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYIDS KVVKTRAEGEWLSFDVTDAVHEWLHHKDRNLGFKISLHC PCCTFVPSNNYIIPNKSEELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIKS TRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRRKGALDAAYCF RNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGA CPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTIL YYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS	30
proTGFβ2 D2G	SLSTCSTLDMDQFMRKRIEAIRGQILSKLKLTSPPEDYPEPE EVPPEVISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEEYYAKE VYKIDMPPFFPSENAIPPTFYRPYFRIVRFDVSAMEKNASNL VKAEFRVFRLQNPKARVPEQRIELYQILKSKDLTSPTQRYID SKVVKTRAEGEWLSFDVTDAVHEWLHHKDRNLGFKISLH CPCCTFVPSNNYIIPNKSEELEARFAGIDGTSTYTSGDQKTIK STRKKNSGKTPHLLLMLLPSYRLESQQTNRRKGALDAAYC FRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAG ACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTI LYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS	31
proTGFβ3	SLSLSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMT HVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAK EIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRT NLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYI GGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHC PCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRL KKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPGQGGQRKKRALDTNY CFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCS GPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPL TILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	32
proTGFβ3 C7S	SLSLSTSTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMT HVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAK EIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRT NLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYI GGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHC PCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRL KKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPGQGGQRKKRALDTNY CFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCS GPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPL TILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	33
proTGFβ3 C7S D2G	SLSLSTSTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMT HVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAK EIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRT NLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYI GGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHC PCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRL KKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPGQGGQRKGALDTNYC	34

	FRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGP CPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTIL YYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	
proTGFβ3 D2G	SLSLSTCTTLDFGHIKKKRVEAIRGQILSKLRLTSPPEPTVMT HVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAK EIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRT NLFRAEFRVLRVPNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQRYI GGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHC PCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVDNEDDHGRGDLGRL KKQKDHHNPHLILMMIPPHRLDNPGQGGQRKGALDTNYC FRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYYANFCSGP CPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTIL YYVGRTPKVEQLSNMVVKSCKCS	35

Таблица 15. Иллюстративные не относящиеся к человеку аминокислотные последовательности

Белок	Вид	Последовательность	SEQ ID NO
proTGFβ1	Мышь	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEV TRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNTSDIREAVPEPP LLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRL LTPTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFRFSAHCS CDSKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHDMNRPFLLLMAT PLERAQHLHSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDF RKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL ALYNQHNPGASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQ LSNMIVRSCKCS	36
proTGFβ1	Яванский макак	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVT RVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPV LLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRL LAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSC DSKDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMAT PLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDF RKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL ALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQ LSNMIVRSCKCS	37
TGFβ1 LAP C4S	Мышь	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEV TRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNTSDIREAVPEPP LLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRL LTPTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFRFSAHCS CDSKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHDMNRPFLLLMAT PLERAQHLHSSRHRR	38
TGFβ1 LAP C4S	Яванский макак	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVT RVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPV LLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRL LAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSC DSKDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMAT PLERAQHLQSSRHRR	39
proTGFβ1 C4S D2G	Мышь	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEV TRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNTSDIREAVPEPP	40

		LLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRL LTPTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFRFSAHCS CDSKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHDMNRPFLLLMAT PLERAQHLHSSRHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFR KDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLA LYNQHNPGASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLS NMIVRSCKCS	
proTGFβ1 C4S	Мышь	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESADPEPEPEADYYAKEV TRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFFNTSDIREAVPEPP LLSRAELRLQRLKSSVEQHVELYQKYSNNSWRYLGNRL LTPTDTPEWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFRFSAHCS CDSKDNKLHVEINGISPKRRGDLGTIHDMNRPFLLLMAT PLERAQHLHSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDF RKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL ALYNQHNPGASASPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQ LSNMIVRSCKCS	41
proTGFβ1 C4S	Яванский макак	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVT RVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPV LLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRL LAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSC DSKDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMAT PLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDF RKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL ALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQ LSNMIVRSCKCS	42
proTGFβ1 C4S D2G	Яванский макак	LSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPP GPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVT RVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPV LLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRL LAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSC DSKDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMAT PLERAQHLQSSRHGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFR KDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLA LYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQL SNMIVRSCKCS	43
LTBP3	Яванский макак	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCR DSCQQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSGFRVVVCPLPCMN GGQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAGGAGGGTGGSGPG LSRAGALSTGALPPLAPEGDSVASKHAIYAVQVIADPPG PGEGPPAQHAAFLVPLGPGQISAEVQAPPPVVNVRVHHP PEASVQVHRIESSNAEGAAPSQHLLPHPKPSHPRPPTQKP LGRCFQDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQS KCHKCPQLQYTGVQKPGPVRGEVGADCPQGYKRLNST HCQDINECAMPGVCRHGDCLNNPGSYRCVCPPGHSLGP SRTQCIADKPEEKSLCFRLVSPEHQCQHPLTTRLTRQLCC CSVGKAWGARCQRCPADGTAAFKEICPAGKGYHILTSH QTLTIQGESDFSLFLHPDGPPKPQQLPESPSQAPPPEDTEE ERGVTTDSPVSEERSVQQSHPTATTSPARPYPELISRPSPP TMRWFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTETDECRLNQNICGHG ECVPGPPDYSCHCNPGYRSHPQHRYCVDVNECEAEPCG PGRGICMNTGGSYNCHCNRGYRLHVGAGGRSCVDLNE CAKPHLCGDGGFCINFPGHYKCNCYPGYRLKASRPPVC EDIDECRDPSSCPDGKCENKPGSFKCIACQPGYRSQGGG ACRDVNECAEGSPCSPGWCENLPGSFRCTCAQGYAPAP DGRSCVDVDECEAGDVCDNGICTNTPGSFQCQCLSGYH	44

		LSRDRSHCEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPQG HRLVGGRKCQDIDECTQDPGLCLPHGACKNLQGSYVCV CDEGFTPTQDQHGCEEVEQPHHKKECYLNFDDTVFCDS VLATNVTQQECCCSLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHS LCPDGKGYTQDNNIVNYGIPAHRDIDECMLFGAEICKEG KCVNTQPGYECYCKQGFYYDGNLLECVDVDECLDESN CRNGVCENTRGGYRCACTPPAEYSPAQRQCLSPEEMDV DECQDPAACRPGRCVNLPGSYRCECRPPWVPGPSGRDC QLPESPAERAPERRDVCWSQRGEDGMCAGPQAGPALTF DDCCCRQGRGWGAQCRPCPPRGAGSQCPTSQSESNSFW DTSPLLLGKPRRDEDSSEEDSDECRCVSGRCVPRPGGAV CECPGGFQLDASRARCVDIDECRELNQRGLLCKSERCV NTSGSFRCVCKAGFARSRPHGACVPQRRR	
LTBP3	Мышь	GPAGERGTGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCR DSCQQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSAFRVVVCPLPCMN GGQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAAGTGAGTGSSGPG LARTGAMSTGPLPPLAPEGESVASKHAIYAVQVIADPPG PGEGPPAQHAAFLVPLGPGQISAEVQAPPPVVNVRVHHP PEASVQVHRIEGPNAEGPASSQHLLPHPKPPHPRPPTQKP LGRCFQDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQS KCHKCPQLQYTGVQKPVPVRGEVGADCPQGYKRLNST HCQDINECAMPGNVCHGDCLNNPGSYRCVCPPGHSLGP LAAQCIADKPEEKSLCFRLVSTEHQCQHPLTTRLTRQLC CCSVGKAWGARCQRCPADGTAAFKEICPGKGYHILTSH QTLTIQGESDFSLFLHPDGPPKPQQLPESPSRAPPLEDTEE ERGVTMDPPVSEERSVQQSHPTTTTSPPRPYPELISRPSPP TFHRFLPDLPPSRSAVEIAPTQVTETDECRLNQNICGHGQ CVPGPSDYSCHCNAGYRSHPQHRYCVDVNECEAEPCGP GKGICMNTGGSYNCHCNRGYRLHVGAGGRSCVDLNEC AKPHLCGDGGFCINFPGHYKCNCYPGYRLKASRPPICED IDECRDPSTCPDGKCENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGAC RDVNECSEGTPCSPGWCENLPGSYRCTCAQYEPAQDGL SCIDVDECEAGKVCQDGICTNTPGSFQCQCLSGYHLSRD RSRCEDIDECDFPAACIGGDCINTNGSYRCLCPLGHRLV GGRKCKKDIDECSQDPGLCLPHACENLQGSYVCVCDEG FTLTQDQHGCEEVEQPHHKKECYLNFDDTVFCDSVLAT NVTQQECCCSLGAGWGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLVPD GKRLHSGQQHCELCIPAHRDIDECILFGAEICKEGKCVNT QPGYECYCKQGFYYDGNLLECVDVDECLDESNCRNGV CENTRGGYRCACTPPAEYSPAQAQCLIPERWSTPQRDV KCAGASEERTACVWGPWAGPALTFDDCCCRQPRLGTQ CRPCPPRGTGSQCPTSQSESNSFWDTSPLLLGKSPRDEDS SEEDSDECRCVSGRCVPRPGGAVCECPGGFQLDASRAR CVDIDECRELNQRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCKAGFTR SRPHGPACLSAAADDAAIAHTSVIDHRGYFH	45
LTBP1S	Яванский макак	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTLISEN GHAADTLTATNFRVVLCHLPCMNGGQCSSRDKCQCPPN FTGKLCQIPVHGASVPKLYQHSQQPGKALGTHVIHSTHT LPLTVTSQQGVKVKFPPNIVNIHVKHPPEASVQIHQVSRI DGPTGQKTKEAQPGQSQVSYQGLPVQKTQTIHSTYSHQ QVIPHVYPVAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSKQED CCGTVGTSWGFNKCQKCPKKPSYHGYNQMMECLPGYK RVNNTFCQDINECQLQGVCPNGECLNTMGSYRCTCKIG FGPDPTFSSCVPDPPVISEEKGPCYRLVSSGRQCMHPLSV HLTKQLCCCSVGKAWGPHCEKCPLPGTAAFKEICPGGM GYTVSGVHRRRPIHHHVGKGPVFVKPKNTQPVAKSTHP PPLPAKEEPVEALTFSREHGPGVAEPEVATAPPEKEIPSL	46

		DQEKTKLEPGQPQLSPGISTIHLHPQFPVVIEKTSPPVPVE VAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGHCINL PVRYTCICYEGYKFSEQQRKCVDIDECTQVQHLCSQGRC ENTEGSFLCICPAGFMASEEGTNCIDVDECLRPDVCGEG HCVNTVGAFRCEYCDSGYRMTQRGRCEDIDECLNPSTC PDEQCVNSPGSYQCVPCTEGFRGWNGQCLDVDECLEPN VCTNGDCSNLEGSYMCSCHKGYTRTPDHKHCKDIDECQ QGNLCVNGQCKNTEGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDID ECQHHHLCAHGQCRNTEGSFQCVCDQGYRASGLGDHC EDINECLEDKSVCQRGDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDN KTCQDINECEHPGLCGPQGECLNTEGSFHCVCQQGFSIS ADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCDNTAGSFRCLCYQG FQAPQDGQGCVDVNECELLSGVCGEAFCENVEGSFLCV CADENQEYSPMTGQCRSRTSTDLDVEQPKEEKKECYYN LNDASLCDNVLAPNVTKQECCCTSGAGWGDNCEIFPCP VLGTAEFTEMCPKGKGFVPAGESSSEAGGENYKDADEC LLFGQEICKNGFCLNTRPGYECYCKQGTYYDPVKLQCF DMDECQDPSSCIDGQCVNTEGSYNCFCTHPMVLDASEK RCIRPAESNEQIEETDVYQDLCWEHLSDEYVCSRPLVGK QTTYTECCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYAQLCNIP VTGRRQPYGRDALVDFSEQYAPEADPYFIQDRFLNSFEE LQAEECGILNGCENGRCVRVQEGYTCDCFDGYHLDTAK MTCVDVNECDELNNRMSLCKNAKCINTEGSYKCLCLPG YVPSDKPNYCTPLNTALNLEKDSDLE	
LTBP1S	Мышь	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGNCQNSCQKGNTTTLISE NGHAADTLTATNFRVVICHLPCMNGGQCSSRDKCQCPP NFTGKLCQIPVLGASMPKLYQHAQQQGKALGSHVIHST HTLPLTMTSQQGVKVKFPPNIVNIHVKHPPEASVQIHQV SRIDSPGGQKVKEAQPGQSQVSYQGLPVQKTQTVHSTY SHQQLIPHVYPVAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSK QEDCCGTVGTSWGFNKCQKCPKKQSYHGYTQMMECL QGYKRVNNTFCQDINECQLQGVCPNGECLNTMGSYRCS CKMGFGPDPTFSSCVPDPPVISEEKGPCYRLVSPGRHCM HPLSVHLTKQICCCSVGKAWGPHCEKCPLPGTAAFKEIC PGGMGYTVSGVHRRRPIHQHIGKEAVYVKPKNTQPVAK STHPPPLPAKEEPVEALTSSWEHGPRGAEPEVVTAPPEK EIPSLDQEKTRLEPGQPQLSPGVSTIHLHPQFPVVVEKTSP PVPVEVAPEASTSSASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAG HCINLPVRYTCICYEGYKFSEQLRKCVDIDECAQVRHLC SQGRCENTEGSFLCVCPAGFMASEEGTNCIDVDECLRPD MCRDGRCINTAGAFRCEYCDSGYRMSRRGYCEDIDECL KPSTCPEEQCVNTPGSYQCVPCTEGFRGWNGQCLDVDE CLQPKVCTNGSCTNLEGSYMCSCHRGYSPTPDHRHCQD IDECQQGNLCMNGQCRNTDGSFRCTCGQGYQLSAAKD QCEDIDECEHHHLCSHGQCRNTEGSFQCVCNQGYRASV LGDHCEDINECLEDSSVCQGGDCINTAGSYDCTCPDGFQ LNDNKGCQDINECAQPGLCGSHGECLNTQGSFHCVCEQ GFSISADGRTCEDIDECVNNTVCDSHGFCDNTAGSFRCL CYQGFQAPQDGQGCVDVNECELLSGVCGEAFCENVEGS FLCVCADENQEYSPMTGQCRSRVTEDSGVDRQPREEKK ECYYNLNDASLCDNVLAPNVTKQECCCTSGAGWGDNC EIFPCPVQGTAEFTEMCPRGKGLVPAGESSYDTGGENYK DADECLLFGEEICKNGYCLNTQPGYECYCKQGTYYDPV KLQCFDMDECQDPNSCIDGQCVNTEGSYNCFCTHPMVL DASEKRCVQPTESNEQIEETDVYQDLCWEHLSEEYVCSR PLVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQCALCPMKDSDDYA QLCNIPVTGRRRPYGRDALVDFSEQYGPETDPYFIQDRF	47

		LNSFEELQAEECGILNGCENGRCVRVQEGYTCDCFDGY HLDMAKMTCVDVNECSELNNRMSLCKNAKCINTEGSY KCLCLPGYIPSDKPNYCTPLNSALNLDKESDLE	
GARP	Мышь	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQALY LSGNQLQSILVSPLGFYTALRHLDLSDNQISFLQAGVFQA LPYLEHLNLAHNRLATGMALNSGGLGRLPLLVSLDLSG NSLHGNLVERLLGETPRLRTLSLAENSLTRLARHTFWG MPAVEQLDLHSNVLMDIEDGAFEALPHLTHLNLSRNSL TCISDFSLQQLQVLDLSCNSIEAFQTAPEPQAQFQLAWL DLRENKLLHFPDLAVFPRLIYLNVSNNLIQLPAGLPRGSE DLHAPSEGWSASPLSNPSRNASTHPLSQLLNLDLSYNEIE LVPASFLEHLTSLRFLNLSRNCLRSFEARQVDSLPCLVLL DLSHNVLEALELGTKVLGSLQTLLLQDNALQELPPYTFA SLASLQRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFSGIPTLH VLNMAGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVATG ALVGLEASLEVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLKRLNLAE NQLSHLPAWTRAVSLEVLDLRNNSFSLLPGNAMGGLET SLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDL ICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKGGLKNVNLILLLSFTLVS AIVLTTLATICFLRRQKLSQQYKA	48
sGARP	Мышь	ISQRREQVPCRTVNKEALCHGLGLLQVPSVLSLDIQALY LSGNQLQSILVSPLGFYTALRHLDLSDNQISFLQAGVFQA LPYLEHLNLAHNRLATGMALNSGGLGRLPLLVSLDLSG NSLHGNLVERLLGETPRLRTLSLAENSLTRLARHTFWG MPAVEQLDLHSNVLMDIEDGAFEALPHLTHLNLSRNSL TCISDFSLQQLQVLDLSCNSIEAFQTAPEPQAQFQLAWL DLRENKLLHFPDLAVFPRLIYLNVSNNLIQLPAGLPRGSE DLHAPSEGWSASPLSNPSRNASTHPLSQLLNLDLSYNEIE LVPASFLEHLTSLRFLNLSRNCLRSFEARQVDSLPCLVLL DLSHNVLEALELGTKVLGSLQTLLLQDNALQELPPYTFA SLASLQRLNLQGNQVSPCGGPAEPGPPGCVDFSGIPTLH VLNMAGNSMGMLRAGSFLHTPLTELDLSTNPGLDVATG ALVGLEASLEVLELQGNGLTVLRVDLPCFLRLKRLNLAE NQLSHLPAWTRAVSLEVLDLRNNSFSLLPGNAMGGLET SLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDL ICRFGSQEELSLSLVRPEDCEKGGLKNVN	49

[406] Согласно некоторым вариантам осуществления антигенные белковые комплексы (например, комплекс LTBP-TGFβ1) могут содержать одну или несколько презентирующих молекул, таких как белки LTBP (например, LTBP1, LTBP2, LTBP3 и LTBP4), белки GARP, белки LRRC33 или их фрагмент(ы). Как правило, минимально необходимый фрагмент, подходящий для осуществления раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления, включает в себя по меньшей мере 50 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 100 аминокислот презентирующей молекулы белка, содержащей по меньшей мере два остатка цистеина, способных образовывать дисульфидные связи с комплексом proTGFβ1. В частности, эти остатки Cys образуют ковалентные связи с остатками цистеина, присутствующими вблизи N-конца каждого мономера комплекса proTGFβ1. В трехмерной структуре димерного комплекса proTGFβ1 N-концевая так называемая «спираль альфа-1» каждого мономера находится в

непосредственной близости друг от друга (см., например, фиг. 18B, две спирали рядом с нижней частью структуры серым цветом), задав расстояние между двумя остатками цистеина (по одному от каждой спирали), необходимое для образования продуктивных ковалентных связей с соответствующей парой цистеинов, присутствующих в презентирующей молекуле (см., например, Cuende et al. (2015) Sci. Trans. Med. 7: 284ra56). Следовательно, когда фрагмент презентирующей молекулы используется для образования LLC в процессе скрининга (например, иммунизация, скрининг библиотеки, идентификация и отбор), такой фрагмент должен включать в себя остатки цистеина, разделенные правильным расстоянием, что позволит получить правильное образование дисульфидной связи с комплексом proTGFβ1 с целью сохранения правильной конформации полученного LLC. LTBP (например, LTBP1, LTBP3 и LTBP4), например, могут содержать «богатые цистеином домены», чтобы опосредовать ковалентные взаимодействия с proTGFβ1.

[407] Антитело или его антигенсвязывающая часть, как описано в настоящем документе, способны связываться с комплексом LTBP1-TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 представляет собой встречающийся в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 представляет собой не встречающийся в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 представляет собой рекомбинантный белок. Такой рекомбинантный белок LTBP1 может содержать LTBP1, его альтернативно сплайсированные варианты и/или его фрагменты. Рекомбинантные белки LTBP1 также могут быть модифицированы для включения одной или нескольких обнаруживаемых меток. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 содержит лидерную последовательность (например, нативную или ненативную лидерную последовательность). Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 не содержит лидерную последовательность (т.е. лидерная последовательность подверглась процессингу или отщеплению). Такие обнаруживаемые метки могут включать в себя без ограничения биотиновые метки, полигистидиновые метки, метки myc, метки HA и/или флуоресцентные метки. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 представляет собой белок LTBP1 млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 представляет собой белок LTBP1 человека, обезьяны, мыши или крысы. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 46 и 47 в таблице 15. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 50 в таблице. 17.

[408] Антитело или его антигенсвязывающая часть, как описано в настоящем документе, способны связываться с комплексом LTBP3-TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 представляет собой встречающийся в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 представляет собой не встречающийся в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 представляет собой рекомбинантный белок. Такой рекомбинантный белок LTBP3 может содержать LTBP3, его альтернативно сплайсированные варианты и/или его фрагменты. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 содержит лидерную последовательность (например, нативную или ненативную лидерную последовательность). Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 не содержит лидерную последовательность (т.е. лидерная последовательность подверглась процессингу или отщеплению). Рекомбинантные белки LTBP3 также могут быть модифицированы для включения одной или нескольких обнаруживаемых меток. Такие обнаруживаемые метки могут включать в себя без ограничения биотиновые метки, полигистидиновые метки, метки myc, метки HA и/или флуоресцентные метки. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 представляет собой белок LTBP3 млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 представляет собой белок LTBP3 человека, обезьяны, мыши или крысы. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP3 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 44 и 45 в таблице 15. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LTBP1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 51 в таблице. 17.

[409] Антитело или его антигенсвязывающая часть, как описано в настоящем документе, способны связываться с комплексом GARP-TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP представляет собой встречающийся в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP представляет собой не встречающийся в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP представляет собой рекомбинантный белок. Такой GARP может быть рекомбинантным, называемым в настоящем документе рекомбинантным GARP. Некоторые рекомбинантные GARP могут содержать одну или несколько модификаций, усечений и/или мутаций по сравнению с GARP дикого типа. Рекомбинантные GARP можно модифицировать, чтобы они стали растворимыми. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP содержит лидерную последовательность (например, нативную или ненативную лидерную последовательность). Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP не содержит лидерную

последовательность (т.е. лидерная последовательность подверглась процессингу или отщеплению). Согласно другим вариантам осуществления рекомбинантные GARP модифицированы для включения одной или нескольких обнаруживаемых меток. Согласно дополнительным вариантам осуществления такие обнаруживаемые метки могут включать в себя без ограничения биотиновые метки, полигистидиновые метки, метки flag, метки myc, метки HA и/или флуоресцентные метки. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP представляет собой белок GARP млекопитающих. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP представляет собой белок GARP человека, обезьяны, мыши или крысы. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 48-49 в таблице 15. Согласно некоторым вариантам осуществления белок GARP содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 52 и 53. в таблице 18. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящем документе, не связываются с TGFβ1 контекстно-зависимым образом, например связывание с TGFβ1 будет происходить только тогда, когда молекула TGFβ1 образована комплексом со специфической презентирующей молекулой, например GARP. Вместо этого антитела и их антигенсвязывающие части связываются с TGFβ1 контекстно-независимым образом. Другими словами, антитела или их антигенсвязывающие части связываются с TGFβ1 при связывании с любой презентирующей молекулой: GARP, LTBP1, LTBP3 и/или LRCC33.

[410] Антитело или его антигенсвязывающая часть, как описано в настоящем документе, способны связываться с комплексом LRRC33-TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 представляет собой встречающийся в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 представляет собой не встречающийся в природе белок или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 представляет собой рекомбинантный белок. Такой LRRC33 может быть рекомбинантным, называемым в настоящем документе рекомбинантным LRRC33. Некоторые рекомбинантные белки LRRC33 могут содержать одну или несколько модификаций, усечений и/или мутаций по сравнению с LRRC33 дикого типа. Рекомбинантные белки LRRC33 можно модифицировать, чтобы они стали растворимыми. Например, согласно некоторым вариантам осуществления эктодомен LRRC33 может экспрессироваться с помощью С-концевой метки His для экспрессии растворимого белка LRRC33 (sLRRC33; см., например, SEQ ID NO: 84). Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 содержит лидерную последовательность (например, нативную или ненативную лидерную последовательность).

Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 не содержит лидерную последовательность (т.е. лидерная последовательность подверглась процессингу или отщеплению). Согласно другим вариантам осуществления рекомбинантные белки LRRC33 модифицированы для включения одной или нескольких обнаруживаемых меток. Согласно дополнительным вариантам осуществления такие обнаруживаемые метки могут включать в себя без ограничения метки биотина, полигистидиновые метки, метки flag, метки myc, метки HA и/или флуоресцентные метки. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 представляет собой белок LRRC33 млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 представляет собой белок LRRC33 человека, обезьяны, мыши или крысы. Согласно некоторым вариантам осуществления белок LRRC33 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 83, 84 и 101 в таблице 18.

Таблица 17. Иллюстративные аминокислотные последовательности LTBP

Белок	Последовательность	SEQ ID NO
LTBP1S	NHTGRIKVVFTPSICKVTCTKGSCQNSCEKGNTTTLISEN GHAADTLTATNFRVVICHLPCMNGGQCSSRDKCQCPPNF TGKLCQIPVHGASVPKLYQHSQQPGKALGTHVIHSTHTLP LTVTSQQGVKVKFPPNIVNIHVKHPPEASVQIHQVSRIDG PTGQKTKEAQPGQSQVSYQGLPVQKTQTIHSTYSHQQVIP HVYPVAAKTQLGRCFQETIGSQCGKALPGLSKQEDCCGT VGTSWGFNKCQKCPKKPSYHGYNQMMECLPGYKRVNN TFCQDINECQLQGVCPNGECLNTMGSYRCTCKIGFGPDPT FSSCVPDPPVISEEKGPCYRLVSSGRQCMHPLSVHLTKQL CCCSVGKAWGPHCEKCPLPGTAAFKEICPGGMGYTVSG VHRRRPIHHHVGKGPVFVKPKNTQPVAKSTHPPPLPAKE EPVEALTFSREHGPGVAEPEVATAPPEKEIPSLDQEKTKLE PGQPQLSPGISTIHLHPQFPVVIEKTSPPVPVEVAPEASTSS ASQVIAPTQVTEINECTVNPDICGAGHCINLPVRYTCICYE GYRFSEQQRKCVDIDECTQVQHLCSQGRCENTEGSFLCIC PAGFMASEEGTNCIDVDECLRPDVCGEGHCVNTVGAFRC EYCDSGYRMTQRGRCEDIDECLNPSTCPDEQCVNSPGSY QCVPCTEGFRGWNGQCLDVDECLEPNVCANGDCSNLEG SYMCSCHKGYTRTPDHKHCRDIDECQQGNLCVNGQCKN TEGSFRCTCGQGYQLSAAKDQCEDIDECQHRHLCAHGQ CRNTEGSFQCVCDQGYRASGLGDHCEDINECLEDKSVCQ RGDCINTAGSYDCTCPDGFQLDDNKTCQDINECEHPGLC GPQGECLNTEGSFHCVCQQGFSISADGRTCEDIDECVNNT VCDSHGFCDNTAGSFRCLCYQGFQAPQDGQGCVDVNEC ELLSGVCGEAFCENVEGSFLCVCADENQEYSPMTGQCRS RTSTDLDVDVDQPKEEKKECYYNLNDASLCDNVLAPNV TKQECCCTSGVGWGDNCEIFPCPVLGTAEFTEMCPKGKG FVPAGESSSEAGGENYKDADECLLFGQEICKNGFCLNTRP GYECYCKQGTYYDPVKLQCFDMDECQDPSSCIDGQCVN TEGSYNCFCTHPMVLDASEKRCIRPAESNEQIEETDVYQD LCWEHLSDEYVCSRPLVGKQTTYTECCCLYGEAWGMQC ALCPLKDSDDYAQLCNIPVTGRRQPYGRDALVDFSEQYT	50

	PEADPYFIQDRFLNSFEELQAEECGILNGCENGRCVRVQE GYTCDCFDGYHLDTAKMTCVDVNECDELNNRMSLCKN AKCINTDGSYKCLCLPGYVPSDKPNYCTPLNTALNLEKD SDLE	
LTBP3	GPAGERGAGGGGALARERFKVVFAPVICKRTCLKGQCR DSCQQGSNMTLIGENGHSTDTLTGSGFRVVVCPLPCMNG GQCSSRNQCLCPPDFTGRFCQVPAGGAGGGTGGSGPGLS RTGALSTGALPPLAPEGDSVASKHAIYAVQVIADPPGPGE GPPAQHAAFLVPLGPGQISAEVQAPPPVVNVRVHHPPEAS VQVHRIESSNAESAAPSQHLLPHPKPSHPRPPTQKPLGRCF QDTLPKQPCGSNPLPGLTKQEDCCGSIGTAWGQSKCHKC PQLQYTGVQKPGPVRGEVGADCPQGYKRLNSTHCQDIN ECAMPGVCRHGDCLNNPGSYRCVCPPGHSLGPSRTQCIA DKPEEKSLCFRLVSPEHQCQHPLTTRLTRQLCCCSVGKA WGARCQRCPTDGTAAFKEICPAGKGYHILTSHQTLTIQGE SDFSLFLHPDGPPKPQQLPESPSQAPPPEDTEEERGVTTDS PVSEERSVQQSHPTATTTPARPYPELISRPSPPTMRWFLPD LPPSRSAVEIAPTQVTETDECRLNQNICGHGECVPGPPDY SCHCNPGYRSHPQHRYCVDVNECEAEPCGPGRGICMNTG GSYNCHCNRGYRLHVGAGGRSCVDLNECAKPHLCGDG GFCINFPGHYKCNCYPGYRLKASRPPVCEDIDECRDPSSC PDGKCENKPGSFKCIACQPGYRSQGGGACRDVNECAEGS PCSPGWCENLPGSFRCTCAQGYAPAPDGRSCLDVDECEA GDVCDNGICSNTPGSFQCQCLSGYHLSRDRSHCEDIDECD FPAACIGGDCINTNGSYRCLCPQGHRLVGGRKCQDIDECS QDPSLCLPHGACKNLQGSYVCVCDEGFTPTQDQHGCEEV EQPHHKKECYLNFDDTVFCDSVLATNVTQQECCCSLGA GWGDHCEIYPCPVYSSAEFHSLCPDGKGYTQDNNIVNYG IPAHRDIDECMLFGSEICKEGKCVNTQPGYECYCKQGFY YDGNLLECVDVDECLDESNCRNGVCENTRGGYRCACTP PAEYSPAQRQCLSPEEMDVDECQDPAACRPGRCVNLPGS YRCECRPPWVPGPSGRDCQLPESPAERAPERRDVCWSQR GEDGMCAGPLAGPALTFDDCCCRQGRGWGAQCRPCPPR GAGSHCPTSQSESNSFWDTSPLLLGKPPRDEDSSEEDSDE CRCVSGRCVPRPGGAVCECPGGFQLDASRARCVDIDECR ELNQRGLLCKSERCVNTSGSFRCVCKAGFARSRPHGACV PQRRR	51

Таблица 18. Иллюстративные аминокислотные последовательности GARP и LRRC33

Белок	**Последовательность**	**SEQ ID NO**
GARP	AQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTETLDLS GNQLRSILASPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALTHL EHLSLAHNRLAMATALSAGGLGPLPRVTSLDLSGNSLYSG LLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDL HSNVLMDIEDGAFEGLPRLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLRV LDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAA LPRLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPS GNASGRPLSQLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRN CLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSHNALETLELGARALGSLRT LLLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEP GPSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFLHTPLTELDLS SNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVLQVDLPCFI CLKRLNLAENRLSHLPAWTQAVSLEVLDLRNNSFSLLPGSA	52

	MGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDA TQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGLKNINLIIILTFILVS AILLTTLAACCCVRRQKFNQQYKA	
sGARP	AQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTETLDLS GNQLRSILASPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALTHL EHLSLAHNRLAMATALSAGGLGPLPRVTSLDLSGNSLYSG LLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDL HSNVLMDIEDGAFEGLPRLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLRV LDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAA LPRLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPS GNASGRPLSQLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRN CLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSHNALETLELGARALGSLRT LLLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEP GPSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFLHTPLTELDLS SNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVLQVDLPCFI CLKRLNLAENRLSHLPAWTQAVSLEVLDLRNNSFSLLPGSA MGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDA TQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGLKNIN	53
LRRC33 (также известен как NRROS; регистр. номер Uniprot Q86YC3)	**MELLPLWLCLGFHFLTVG**WRNRSGTATAASQGVCKLVG GAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLWNHSLQ PYPLLESLSLHSCHLERISRGAFQEQGHLRSLVLGDNCLSEN YEETAAALHALPGLRRLDLSGNALTEDMAALMLQNLSSLR SVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERLRELDLQRNYIFEIEGGAFD GLAELRHLNLAFNNLPCIVDFGLTRLRVLNVSYNVLEWFL ATGGEAAFELETLDLSHNQLLFFPLLPQYSKLRTLLLRDNN MGFYRDLYNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVSLWEEFS SSDLADLRFLDMSQNQFQYLPDGFLRKMPSLSHLNLHQNC LMTLHIREHEPPGALTELDLSHNQLSELHLAPGLASCLGSL RLFNLSSNQLLGVPPGLFANARNITTLDMSHNQISLCPLPAA SDRVGPPSCVDFRNMASLRSLSLEGCGLGALPDCPFQGTSL TYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNMGLHSSF MALDFSGFGNLRDLDLSGNCLTTFPRFGGSLALETLDLRRN SLTALPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQNPYDCCGVDGWGALQ HGQTVADWAMVTCNLSSKIIRVTELPGGVPRDCKWERLDL GLLYLVLILPSCLTLLVACTVIVLTFKKPLLQVIKSRCHWSS VY * Нативный сигнальный пептид выделен жирным шрифтом.	83
растворимый LRRC33 (sLRRC33)	**MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLG**WRNRSGTATAASQGV CKLVGGAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLW NHSLQPYPLLESLSLHSCHLERISRGAFQEQGHLRSLVLGD NCLSENYEETAAALHALPGLRRLDLSGNALTEDMAALML QNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERLRELDLQRNYIFE IEGGAFDGLAELRHLNLAFNNLPCIVDFGLTRLRVLNVSYN VLEWFLATGGEAAFELETLDLSHNQLLFFPLLPQYSKLRTL LLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVS LWEEFSSSDLADLRFLDMSQNQFQYLPDGFLRKMPSLSHL NLHQNCLMTLHIREHEPPGALTELDLSHNQLSELHLAPGLA SCLGSLRLFNLSSNQLLGVPPGLFANARNITTLDMSHNQISL CPLPAASDRVGPPSCVDFRNMASLRSLSLEGCGLGALPDCP FQGTSLTYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNM GLHSSFMALDFSGFGNLRDLDLSGNCLTTFPRFGGSLALET LDLRRNSLTALPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQNPYDCCGVDG WGALQHGQTVADWAMVTCNLSSKIIRVTELPGGVPRDCK WERLDLGL<u>HHHHHH</u>	84

	* Модифицированный сигнальный пептид легкой каппа-цепи человека выделен жирным шрифтом. ** Гистидиновая метка подчеркнута.	
Химера LRRC33 - GARP человека	**MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLG**WRNRSGTATAASQGV CKLVGGAADCRGQSLASVPSSLPPHARMLTLDANPLKTLW NHSLQPYPLLESLSLHSCHLERISRGAFQEQGHLRSLVLGD NCLSENYEETAAALHALPGLRRLDLSGNALTEDMAALML QNLSSLRSVSLAGNTIMRLDDSVFEGLERLRELDLQRNYIFE IEGGAFDGLAELRHLNLAFNNLPCIVDFGLTRLRVLNVSYN VLEWFLATGGEAAFELETLDLSHNQLLFFPLLPQYSKLRTL LLRDNNMGFYRDLYNTSSPREMVAQFLLVDGNVTNITTVS LWEEFSSSDLADLRFLDMSQNQFQYLPDGFLRKMPSLSHL NLHQNCLMTLHIREHEPPGALTELDLSHNQLSELHLAPGLA SCLGSLRLFNLSSNQLLGVPPGLFANARNITTLDMSHNQISL CPLPAASDRVGPPSCVDFRNMASLRSLSLEGCGLGALPDCP FQGTSLTYLDLSSNWGVLNGSLAPLQDVAPMLQVLSLRNM GLHSSFMALDFSGFGNLRDLDLSGNCLTTFPRFGGSLALET LDLRRNSLTALPQKAVSEQLSRGLRTIYLSQNPYDCCGVDG WGALQHGQTVADWAMVTCNLSSKIIRVTELPGGVPRDCK WERLDLGL*LIIILTFILVSAILLTTLAACC*CVRRQKFNQQYKA * Модифицированный сигнальный пептид легкой каппа-цепи человека выделен жирным шрифтом. ** Эктодомен LRRC33 подчеркнута. # Трансмембранный домен GARP выделен курсивом. ## Внутриклеточный хвост GARP подчеркнут дважды.	101

Фармацевтические композиции и составы

[411] Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, используемым в качестве лекарственного средства, подходящего для введения субъектам-людям и субъектам, не относящимся к человеку. Одно или несколько высокоаффинных, контекстно-независимых антител, предусмотренных настоящим изобретением, могут быть составлены или смешаны с фармацевтически приемлемым носителем (вспомогательным веществом), включая в себя, например, буфер, для образования фармацевтической композиции. Такие составы можно использовать для лечения заболевания или нарушения, которое характеризуется передачей сигналов TGFβ. Согласно особенно предпочтительным вариантам осуществления такие составы можно использовать для иммуноонкологических применений.

[412] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить пациентам для облегчения симптомов, связанных с TGFβ (например, фиброза, иммунных нарушений и/или рака). «Приемлемый» означает, что носитель совместим с активным ингредиентом композиции (и предпочтительно, способен стабилизировать активный ингредиент) и не вреден для субъекта, подлежащего лечению. Примеры фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ (носителей), включая в себя буферы, очевидны для квалифицированного специалиста в настоящей области техники и

описаны ранее. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20-е изд. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover. В одном примере описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция содержит более одного антитела, которое специфически связывает комплекс GARP-proTGFβ1, комплекс LTBP1-proTGFβ1, комплекс LTBP3-proTGFβ1 и комплекс LRRC33-proTGFβ1, причем антитела распознают различные эпитопы/остатки комплекса.

[413] Фармацевтические композиции, используемые в настоящих способах, могут содержать фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы в форме лиофилизированных составов или водных растворов (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20-е изд. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. KE Hoover). Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях и могут включать в себя буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая в себя аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (менее приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая в себя глюкозу, маннозу или декстраны; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG). Далее в настоящем документе описаны фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества.

[414] Настоящее изобретение также включает в себя фармацевтические композиции, которые содержат антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[415] Таким образом, антитело или молекула, содержащая антигенсвязывающий фрагмент такого антитела, может быть составлена в виде фармацевтической композиции, подходящей для введения человеку.

[416] Фармацевтический состав может включать в себя одно или несколько вспомогательных веществ. Согласно некоторым вариантам осуществления

вспомогательное(ые) вещество(а) могут быть выбраны из следующего перечня: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.Cfm?event=browseByLetter.page&Letter=A

[417] Фармацевтическая композиция, как правило, составлена с конечной концентрацией активного биологического вещества (например, моноклонального антитела, сконструированной связывающей молекулы, содержащей антигенсвязывающий фрагмент и т.д.) от приблизительно 2 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. Например, конечная концентрация (мас./об.) составов может находиться в диапазоне приблизительно 2-200, 2-180, 2-160, 2-150, 2-120, 2-100, 2-80, 2-70, 2-60, 2-50, 2-40, 5-200, 5-180, 5-160, 5-150, 5-120, 5-100, 5-80, 5-70, 5-60, 5-50, 5-40, 10-200, 10-180, 10-160, 10-150, 10-120, 10-100, 10-80, 10-70, 10-60, 10-50, 10-40, 20-200, 20-180, 20-160, 20-150, 20-120, 20-100, 20-80, 20-70, 20-60, 20-50, 20-40, 30-200, 30-180, 30-160, 30-150, 30-120, 30-100, 30-80, 30-70, 30-60, 30-50, 30-40, 40-200, 40-180, 40-160, 40-150, 40-120, 40-100, 40-80, 40-70, 40-60, 40-50, 50-200, 50-180, 50-160, 50-150, 50-120, 50-100, 50-80, 50-70, 50-60, 60-200, 60-180, 60-160, 60-150, 60-120, 60-100, 60-80, 60-70, 70-200, 70-180, 70-160, 70-150, 70-120, 70-100, 70-80 мг/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления конечная концентрация активного биологического вещества в составе составляет приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 мг/мл.

[418] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно составляют с подходящими буферами. Подходящие буферы включают в себя без ограничения: фосфатный буфер, цитратный буфер и гистидиновый буфер.

[419] Конечное значение pH состава, как правило, составляет от 5,0 до 8,0. Например, pH фармацевтической композиции может составлять приблизительно 5,0, 5,2, 5,5, 6,0, 6,2, 6,5, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, 7,5, 7,6 или 7,8.

[420] Фармацевтическая композиция согласно настоящему раскрытию может содержать поверхностно-активное вещество, такое как неионогенный детергент, одобренный для использования в фармацевтических составах. К таким поверхностно-активным веществам относятся, например, полисорбаты, такие как Полисорбат 20 (Твин-20), Полисорбат 80 (Твин-80) и NP-40.

[421] Фармацевтическая композиция согласно настоящему раскрытию может содержать стабилизатор. Для жидких белковых препаратов стабильность можно повысить путем выбора pH-буферных солей, и часто также можно использовать аминокислоты. Часто взаимодействия на границе раздела жидкость/воздух или жидкость/твердое тело (с упаковкой) приводят к агрегации после адсорбции и разворачивания белка. Подходящие

стабилизаторы включают в себя без ограничения: сахарозу, мальтозу, сорбит, а также определенные аминокислоты, такие как гистидин, глицин, метионин и аргинин.

[422] Фармацевтическая композиция согласно настоящему раскрытию может содержать один или любые комбинации следующих вспомогательных веществ: фосфат натрия, аргинин, сахароза, хлорид натрия, трометамин, маннит, бензиловый спирт, гистидин, сахароза, полисорбат 80, цитрат натрия, глицин, полисорбат 20, трегалоза, полоксамер 188, метионин, трегалоза, rh-гиалуронидаза, сукцинат натрия, фосфат калия, динатрийэдетат, хлорид натрия, хлорид калия, мальтоза, гистидинацетат, сорбит, диэтилентриаминпентауксусная кислота, сывороточный альбумин человека, диэтилентриаминпентауксусная кислота.

[423] Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция согласно настоящему раскрытию может содержать консервант.

[424] Фармацевтическая композиция согласно настоящему раскрытию, как правило, представлена в жидкой или лиофилизированной форме. Как правило, продукты могут быть представлены во флаконах (например, в стеклянных флаконах). Продукты, доступные в шприцах, ручках или автоинжекторах, могут быть представлены в виде предварительно заполненных жидкостей в этих системах упаковки/укупорки.

[425] В некоторых примерах описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция содержит липосомы, содержащие антитело, которое специфически связывается с комплексом GARP-proTGFβ1, комплексом LTBP1-proTGFβ1, комплексом LTBP3-proTGFβ1 и комплексом LRRC33-proTGFβ1, которые можно получить с помощью любого подходящего способа, такого как описанный в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); и патентах США №№ 4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенным временем циркуляции раскрыты в патенте США № 5013556. Особенно применимые липосомы могут быть получены методом испарения с обращенной фазой с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и PEG-дериватизированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE). Липосомы экструдируют через фильтры с определенным размером пор, чтобы получить липосомы требуемого диаметра.

[426] Согласно некоторым вариантам осуществления липосомы с нацеливающими свойствами выбирают для предпочтительной доставки или локализации фармацевтической композиции в определенных тканях или типах клеток. Например, можно использовать определенные носители на основе наночастиц со свойствами нацеливания на костный мозг, например наночастицы на основе липидов или липосомы. См., например, Sou (2012) “Advanced drug carriers targeting bone marrow”, публикация ResearchGate 232725109.

[427] Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут содержать или могут использоваться вместе с адъювантом. Предполагается, что определенный адъювант может усиливать иммунные ответы субъекта, например, на опухолевые антигены, и облегчать функцию Т-эффекторов, дифференцировку DC из моноцитов, повышенное поглощение и презентацию антигена с помощью APC и т.д. Подходящие адъюванты включают в себя без ограничения адъюванты на основе ретиноевой кислоты и их производные, адъюванты на основе эмульсии масло-в-воде, такие как MF59 и другие адъюванты, содержащие сквален, лиганды Toll-подобных рецепторов (TRL) (например, CpG), α-токоферол (витамин E) и их производные.

[428] Антитела, описанные в настоящем документе, также могут быть заключены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или межфазной полимеризации, например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы из поли-(метилметацилата), соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсиях. Иллюстративные tметоды были описаны ранее, см., например, Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20-е изд. Mack Publishing (2000).

[429] В других примерах описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция может быть составлена в формате с длительным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с длительным высвобождением включают в себя полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, причем эти матрицы имеют форму изделий определенной формы, например пленки или микрокапсулы. Примеры матриц с длительным высвобождением включают в себя полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поливиниловый спирт), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и 7-этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и ацетата лейпролида), изобутират ацетата сахарозы и поли-D-(-)-3-оксимасляная кислота.

[430] Фармацевтические композиции, используемые для введения in vivo, должны быть стерильными. Это легко достигается, например, фильтрацией через стерильные фильтрующие мембраны. Терапевтические композиции антител, как правило, помещаются в контейнер, имеющий отверстие для стерильного доступа, например, пакет с раствором

для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций.

[431] Описанные в настоящем документе фармацевтические композиции могут находиться в виде стандартных дозированных форм, таких как таблетки, пилюли, капсулы, порошки, гранулы, растворы или суспензии, или суппозитории, для перорального, парентерального или ректального введения или введения путем ингаляции или инсуффляции.

[432] Подходящие поверхностно-активные агенты включают в себя, в частности, неионные агенты, такие как полиоксиэтиленсорбитаны (например, Tween™ 20, 40, 60, 80 или 85) и другие сорбитаны (например, Span™ 20, 40, 60, 80 или 85). Композиции с поверхностно-активным агентом обычно содержат от 0,05 до 5% поверхностно-активного агента и могут составлять от 0,1 до 2,5%. Следует понимать, что при необходимости могут быть добавлены другие ингредиенты, например маннит или другие фармацевтически приемлемые носители.

[433] Подходящие эмульсии могут быть получены с использованием коммерчески доступных жировых эмульсий, таких как Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ и Lipiphysan™. Активный ингредиент может быть либо растворен в предварительно смешанной композиции эмульсии, либо, альтернативно, он может быть растворен в масле (например, соевом масле, сафлоровом масле, хлопковом масле, кунжутном масле, кукурузном масле или миндальном масле) и эмульсии, образованной при смешивании с фосфолипидом (например, яичные фосфолипиды, фосфолипиды сои или соевый лецитин) и водой. Следует понимать, что могут быть добавлены другие ингредиенты, например глицерин или глюкоза, для регулирования тоничности эмульсии. Подходящие эмульсии, как правило, содержат до 20% масла, например от 5 до 20%.

[434] Эмульсионные композиции могут быть получены путем смешивания антитела согласно настоящему изобретению с Intralipid™ или его компонентами (соевое масло, яичные фосфолипиды, глицерин и вода).

Наборы для использования при обнаружении, мониторинге или облегчении показаний, связанных с TGFβ

[435] Согласно настоящему раскрытию также предусмотрены наборы для использования для облегчения заболеваний/нарушений, ассоциированных с показанием, связанным с TGFβ. Такие наборы могут включать в себя один или несколько контейнеров, содержащих антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связываются с комплексом GARP-TGFβ1, комплексом LTBP1-TGFβ1, комплексом LTBP3-

TGFβ1 и/или комплексом LRRC33-TGFβ1, например, любым из описанных в настоящем документе.

[436] Согласно некоторым вариантам осуществления набор может содержать инструкции по применению в соответствии с любым из способов, описанных в настоящем документе. Включенные инструкции могут содержать описание введения антитела или его антигенсвязывающей части, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1 для лечения, отсрочки начало или облегчения целевого заболевания, как те, которые описаны в настоящем документе. Набор может дополнительно содержать описание выбора индивидуума, подходящего для лечения, на основе определения того, имеет ли этот индивидуум целевое заболевание. Согласно другим вариантам осуществления инструкции содержат описание введения антитела или его антигенсвязывающей части индивидууму, подверженному риску целевого заболевания.

[437] Инструкции, касающиеся использования антител или их антигенсвязывающих частей, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, как правило, включают в себя информацию относительно дозировки, схемы введения доз и пути введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут представлять собой стандартные дозы, упаковки нарасфасованных доз (например, многодозовые упаковки) или субъединичные дозы. Инструкции, поставляемые в наборах согласно настоящему раскрытию, как правило, представляют собой письменные инструкции на этикетке или вкладыше в упаковку (например, лист бумаги, включенный в набор), но машиночитаемые инструкции (например, инструкции на магнитном или оптическом запоминающем диске) также являются приемлемыми.

[438] На этикетке или вкладыше в упаковку указано, что композиция используется для лечения, отсрочки начала и/или облегчения заболевания или нарушения, ассоциированного с показанием, связанным с TGFβ. Могут быть предоставлены инструкции по применению любого из описанных в настоящем документе способов.

[439] Наборы согласно настоящему раскрытию находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает без ограничения флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и т.п. Кроме того, предусмотрены упаковки для использования в сочетании с конкретным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения (например, распылитель) или устройство для инфузии, такое как мининасос. Набор может иметь отверстие для стерильного доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором

для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций). Контейнер может также иметь отверстие для стерильного доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере одно активное средство в композиции представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, как описано в настоящем документе.

[440] Наборы могут дополнительно предоставлять дополнительные компоненты, такие как буферы и информация по интерпретации. Как правило, набор содержит контейнер и этикетку или вкладыш(и) в упаковку на контейнере или связанные с ним. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие предусматривает готовые изделия, содержащие содержимое наборов, описанных выше.

Способ скрининга, идентификации и производства высокоаффинных специфических в отношении изоформы ингибиторов TGFβ1

[441] Настоящее изобретение охватывает способы скрининга/отбора, способы получения и процессы производства антител или их фрагментов, способных связывать каждый из следующего: комплекс GARP-proTGFβ1, комплекс LTBP1-proTGFβ1, комплекс LTBP3-proTGFβ1 и комплекс LRRC33-proTGFβ1, с эквивалентными аффинностями, и фармацевтические композиции и родственные наборы, содержащие их. Для целей скрининга предпочтительно, чтобы был включен по меньшей мере один из комплексов LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ1 и по меньшей мере один из комплексов GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1, чтобы максимизировать шанс идентификации требуемых антител с широкой специфичностью связывания по отношению как к комплексам, ассоциированным с ECM, так и комплексам, ассоциированным с клетками. Антитела или их фрагменты, идентифицированные в процессе скрининга, предпочтительно дополнительно тестируют для подтверждения их способности связывать каждый из представляющих интерес LLC с высокой аффинностью.

[442] Для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему раскрытию можно использовать многочисленные способы. Например, антитела можно получить с использованием способов рекомбинантной ДНК. Моноклональные антитела также можно получить путем создания гибридом (см., например, Kohler and Milstein (1975) Nature, 256: 495-499) в соответствии с известными способами. Гибридомы, образованные таким образом, затем подвергают скринингу с

использованием стандартных способов, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и анализ поверхностного плазмонного резонанса (например, OCTET® или BIACORE), чтобы идентифицировать одну или несколько гибридом, которые продуцируют антитело, которое специфически связывается с указанным антигеном. Любая форма указанного антигена может быть использована в качестве иммуногена, например рекомбинантный антиген, его встречающиеся в природе формы, любые варианты или фрагменты, а также его антигенный пептид (например, любой из эпитопов, описанных в настоящем документе как линейный эпитоп или в пределах каркаса в виде конформационного эпитопа). Один иллюстративный способ получения антител предусматривает скрининг библиотек экспрессии белков, которые экспрессируют антитела или их фрагменты (например, scFv), например библиотеки фагового или рибосомного дисплея. Фаговый дисплей описан, например, в Ladner et al., патенте США № 5223409; Smith (1985) Science 228:1315-1317; Clackson et al. (1991) Nature, 352: 624-628; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222: 581-597; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; и WO 90/02809.

[443] В дополнение к использованию дисплейных библиотек указанный антиген (например, комплексы презентирующая молекула-TGFβ1) можно использовать для иммунизации не являющегося человеком хозяина, например кролика, морской свинки, крысы, мыши, хомяка, овцы, коза, курица, верблюда, а также хозяев - не млекопитающих, таких как акула. Согласно одному варианту осуществления животное, не являющееся человеком, представляет собой мышь.

[444] Иммунизация не являющегося человеком хозяина может быть проведена с использованием очищенного рекомбинантного белкового комплекса в качестве иммуногена, такого как proTGFβ1 с или без презентирующей молекулы (или ее фрагмента), ассоциированной с ним. Они включают в себя без ограничения: LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1. Ассоциированная презентирующая молекула не обязательно должна быть полноразмерным аналогом, но предпочтительно включает в себя два остатка цистеина, которые образуют ковалентные связи с димерным комплексом proTGFβ1.

[445] В качестве альтернативы иммунизация не являющегося человеком хозяина может быть проведена с использованием клеточного антигена. Термин «клеточный антиген» относится к клеткам (например, гетерологичным клеткам), экспрессирующим белковый комплекс proTGFβ1. Это может быть достигнуто за счет избыточной экспрессии proTGFβ1, необязательно с коэкспрессией предпочтительной презентирующей молекулы. Согласно некоторым вариантам осуществления эндогенный(е) аналог(и) можно

использовать в качестве клеточного антигена. Экспрессия на клеточной поверхности белков, которые образуют протеиновый комплекс, содержащий proTGFβ1, может быть подтверждена хорошо известными способами, такими как FACS. При иммунизации хозяина такими клетками (клеточным антигеном) в хозяине вызываются иммунные ответы на антиген, что позволяет продуцировать антитела и проводить последующий скрининг. Согласно некоторым вариантам осуществления используют подходящих животных с нокаутом, чтобы способствовать более сильным иммунным ответам на антиген. Альтернативно, структурные различия между разными видами могут быть достаточными для запуска продукции антител в организме хозяина.

[446] Согласно другому варианту осуществления моноклональное антитело получают от животного, не являющегося человеком, а затем модифицируют, например, химерно, с использованием подходящих методов рекомбинантной ДНК. Описаны различные подходы к получению химерных антител. См., например, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda et al., Nature 314:452, 1985, Cabilly et al., патент США № 4816567; Boss et al., патент США № 4816397; Tanaguchi et al., публикация европейского патента EP 171496; публикация европейского патента 0173494, патент Великобритании GB 2177096B.

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

[448] Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к клеткам-хозяевам, трансформированным полинуклеотидом или вектором. Клетки-хозяева могут являться прокариотическими или эукариотическими клетками. Полинуклеотид или вектор, который присутствует в клетке-хозяине, может быть либо интегрирован в геном клетки-хозяина, либо он может поддерживаться внехромосомно. Клетка-хозяин может являться любой прокариотической или эукариотической клеткой, такой как клетка бактерий, насекомых, грибов, растений, животных или человека. Согласно некоторым вариантам осуществления грибковые клетки представляют собой, например, клетки рода Saccharomyces, в частности клетки вида S. cerevisiae. Термин «прокариотический» включает в себя все бактерии, которые можно трансформировать или трансфицировать молекулами ДНК или РНК для экспрессии антитела или соответствующих цепей иммуноглобулина. Прокариотические хозяева могут включать в себя грамотрицательные, а также грамположительные бактерии, такие как, например, *E. coli, S. typhimurium, Serratia marcescens* и *Bacillus subtilis*. Термин «эукариотический» включает в себя клетки дрожжей, высших растений, насекомых и

позвоночных, например, клетки млекопитающих, такие как клетки NSO и CHO. В зависимости от хозяина, используемого в процедуре рекомбинантного получения, антитела или цепи иммуноглобулина, кодируемые полинуклеотидом, могут быть гликозилированы или могут быть негликозилированными. Антитела или соответствующие цепи иммуноглобулина могут также включать в себя начальный аминокислотный остаток метионина.

[449] Согласно некоторым вариантам осуществления после того, как вектор был встроен в подходящего хозяина, хозяин может поддерживаться в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей и, при желании, сбора и очистки легких цепей иммуноглобулина, тяжелых цепей, димеров легкой/тяжелой цепей или интактных антител, антигенсвязывающих фрагментов или других форм иммуноглобулинов; см. Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N.Y., (1979). Таким образом, в клетки вводят полинуклеотиды или векторы, которые, в свою очередь, продуцируют антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, трансгенных животных, предпочтительно млекопитающих, содержащих вышеупомянутые клетки-хозяева, можно использовать для крупномасштабного производства антитела или фрагментов антител.

[450] Трансформированные клетки-хозяева можно выращивать в ферментерах и культивировать с использованием любых подходящих методик для достижения оптимального роста клеток. После экспрессии целые антитела, их димеры, отдельные легкие и тяжелые цепи, другие формы иммуноглобулинов или антигенсвязывающие фрагменты могут быть очищены в соответствии со стандартными процедурами в настоящей области техники, включая в себя осаждение сульфатом аммония, аффинные колонки, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и т.п.; см. Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). Затем антитело или антигенсвязывающие фрагменты можно выделить из ростовой среды, клеточных лизатов или фракций клеточных мембран. Выделение и очистка, например, экспрессируемых микроорганизмами антител или антигенсвязывающих фрагментов может осуществляться любыми общепринятыми способами, такими как, например, виды препаративного хроматографического разделения и иммунологического разделения, такие как те, которые предусматривают использование моноклональных или поликлональных антител, направленных, например, против константной области антитела.

[451] Аспекты согласно настоящему раскрытию относятся к гибридоме, которая обеспечивает неограниченно пролонгированный источник моноклональных антител. В качестве альтернативы получению иммуноглобулинов непосредственно из культуры

гибридом иммортализованные клетки гибридомы можно использовать в качестве источника реаранжированных локусов тяжелой и легкой цепей для последующей экспрессии и/или генетических манипуляций. Реаранжированные гены антител могут быть подвергнуты обратной транскрипции с соответствующих мРНК для получения кДНК. Согласно некоторым вариантам осуществления константная область тяжелой цепи может быть заменена на область другого изотипа или полностью исключена. Вариабельные области могут быть связаны для кодирования одноцепочечных областей Fv. Множественные области Fv могут быть связаны для придания связывающей способности по отношению к более чем одной мишени или могут использоваться комбинации химерных тяжелых и легких цепей. Для клонирования вариабельных областей антител и получения рекомбинантных антител можно использовать любой подходящий способ.

[452] Согласно некоторым вариантам осуществления получают подходящую нуклеиновую кислоту, которая кодирует вариабельные области тяжелой и/или легкой цепи, и вставляют в экспрессионные векторы, которые можно трансфицировать в стандартные рекомбинантные клетки-хозяева. Можно использовать множество таких клеток-хозяев. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки-хозяева млекопитающих могут быть полезными для эффективного процессинга и продукции. Типичные линии клеток млекопитающих, применимые для этой цели, включают в себя клетки CHO, клетки 293 или клетки NSO. Получение антитела или антигенсвязывающего фрагмента может осуществляться путем культивирования модифицированного рекомбинантного хозяина в условиях культивирования, подходящих для роста клеток-хозяев и экспрессии кодирующих последовательностей. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно выделить путем выделения их из культуры. Системы экспрессии могут быть сконструированы так, чтобы включать в себя сигнальные пептиды, так что полученные антитела секретируются в среду; однако также возможна внутриклеточная продукция.

[453] Настоящее раскрытие также включает в себя полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере вариабельную область иммуноглобулиновой цепи описанных в настоящем документе антител. Согласно некоторым вариантам осуществления вариабельная область, кодируемая полинуклеотидом, содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) V_H и/или V_L вариабельной области антитела, продуцируемого любой из описанных выше гибридом.

[454] Полинуклеотиды, кодирующие антитело или антигенсвязывающие фрагменты, могут представлять собой, например, ДНК, кДНК, РНК или синтетически полученную ДНК или РНК, или рекомбинантно полученную молекулу химерной нуклеиновой кислоты, содержащую любой из этих полинуклеотидов по отдельности или в

комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотид является частью вектора. Такие векторы могут содержать дополнительные гены, такие как гены-маркеры, которые позволяют осуществить селекцию вектора в подходящей клетке-хозяине и в подходящих условиях.

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

[456] Помимо элементов, которые отвечают за инициацию транскрипции, такие регуляторные элементы могут также включать в себя сигналы терминации транскрипции, такие как сайт SV40-поли-A или сайт tk-поли-A, расположенные ниже полинуклеотида. Кроме того, в зависимости от используемой системы экспрессии лидерные последовательности, способные направлять полипептид в клеточный компартмент или секретировать его в среду, могут быть добавлены к кодирующей последовательности полинуклеотида и были описаны ранее. Лидерная(ые) последовательность(и) собирается(ются) в подходящей фазе с последовательностями трансляции, инициации и терминации и предпочтительно с лидерной последовательностью, способной управлять секрецией транслируемого белка или его части, например, во внеклеточную среду. Необязательно, может быть использована гетерологичная полинуклеотидная последовательность, которая кодирует слитый белок, включая в себя C- или N-концевой идентификационный пептид, придающий желаемые характеристики, например стабилизацию или упрощенную очистку экспрессированного рекомбинантного продукта.

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

[458] Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности контроля экспрессии представлены в виде систем эукариотических промоторов в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева, но также могут использоваться последовательности контроля для прокариотических хозяев. Экспрессирующие векторы, полученные из вирусов, таких как ретровирусы, вирус осповакцины, аденоассоциированный вирус, вирусы герпеса или вирус папилломы крупного рогатого скота, могут использоваться для доставки полинуклеотидов или вектора в популяцию клеток-мишеней (например, для конструирования клетки для экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента). Для конструирования рекомбинантных вирусных векторов можно использовать множество подходящих способов. Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотиды и векторы могут быть преобразованы в липосомы для доставки в клетки-мишени. Векторы, содержащие полинуклеотиды (например, вариабельный(е) домен(ы) тяжелой и/или легкой цепей иммуноглобулинов, кодирующих последовательности и последовательности контроля экспрессии), могут быть перенесены в клетку-хозяин подходящими способами, которые варьируются в зависимости от типа клетки-хозяина.

[459] Способы скрининга могут предусматривать стадию оценки или подтверждения желаемой активности антитела или его фрагмента. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия предусматривает выбор способности ингибировать целевую функцию, например, ингибирование высвобождения зрелого/растворимого фактора роста (например, TGFβ1) из латентного комплекса. Согласно предпочтительным вариантам осуществления такая стадия предусматривает клеточный анализ активности, в котором ингибирующая активность тестируемого антитела или антител анализируется путем измерения содержания фактора роста, высвобождаемого в среде (например, в аналитическом растворе) при активации, когда комплекс proTGFβ экспрессируется на

поверхности клетки. Содержание фактора роста, высвобожденного в среду/раствор, можно оценить, например, путем измерения активности TGFβ. Неограничивающие примеры применимых анализов активности на основе клеток описаны в примере 2 в настоящем документе.

[460] Согласно некоторым вариантам осуществления стадия скрининга желаемых антител или фрагментов предусматривает отбор антител или их фрагментов, которые способствуют интернализации и последующему удалению комплексов антитело-антиген с поверхности клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия предусматривает отбор антител или их фрагментов, которые индуцируют ADCC. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия предусматривает отбор антител или их фрагментов, которые накапливаются в желаемом(ых) сайте(ах) in vivo (например, тип клетки, ткань или орган). Согласно некоторым вариантам осуществления стадия предусматривает отбор антител или их фрагментов, способных преодолевать гематоэнцефалический барьер. Способы могут необязательно предусматривать стадию оптимизации одного или нескольких антител или их фрагментов для получения вариантных аналогов, которые обладают желаемыми профилями, определяемыми такими критериями, как стабильность, аффинность связывания, функциональность (например, ингибирующие активности, функция Fc и т.д.), иммуногенность, чувствительность к pH и проявляющая способность (например, высокая растворимость, низкая самоассоциация и т. д.).

[461] Способ получения композиции, содержащей антитело или фрагмент согласно настоящему изобретению, может предусматривать оптимизацию антитела или антител, которые, как было установлено, обладают желаемыми связывающими и функциональными (например, ингибирующими) свойствами. Оптимизация может включать в себя созревание аффинности антитела или его фрагмента. Для обеспечения физико-химических свойств, которые являются полезными для терапевтических композиций, могут быть выполнены дополнительные стадии оптимизации. Такие стадии могут предусматривать без ограничения мутагенез или конструирование для обеспечения улучшенной растворимости, отсутствия самоагрегации, стабильности, чувствительности к pH, функции Fc и так далее. Полученное оптимизированное антитело предпочтительно представляет собой полностью человеческое антитело или гуманизированное антитело, подходящее для введения человеку.

[462] Способ производства фармацевтической композиции, содержащей такое антитело или его фрагмент, может предусматривать стадии очистки, составления, стерильной фильтрации, упаковки и т.д. Некоторые стадии, такие как, например, стерильная фильтрация, выполняют в соответствии с руководящими принципами,

установленными соответствующими регулирующими органами, такими как FDA. Такие композиции могут быть доступны в форме одноразовых контейнеров, таких как предварительно заполненные шприцы, или контейнеров с множеством доз, таких как флаконы.

Модификации

[463] Антитела или их антигенсвязывающие части согласно настоящему раскрытию могут быть модифицированы обнаруживаемой меткой или обнаруживаемым фрагментом, включая в себя без ограничения фермент, простетическую группу, флуоресцентный материал, люминесцентный материал, биолюминесцентный материал, радиоактивный материал, позитронно-активный металл, нерадиоактивный ион парамагнитного металла и аффинная метка для обнаружения и выделения комплекса GARP-proTGFβ1, комплекса LTBP1-proTGFβ1, комплекса LTBP3-proTGFβ1 и/или комплекса LRRC33-proTGFβ1. Обнаруживаемое вещество или фрагмент могут быть соединены или конъюгированы либо непосредственно с полипептидами согласно настоящему раскрытию, либо опосредованно, через промежуточное соединение (такое как, например, линкер (например, расщепляемый линкер)) с использованием подходящих методик. Неограничивающие примеры подходящих ферментов включают в себя пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β-галактозидазу, глюкозооксидазу или ацетилхолинэстеразу; неограничивающие примеры подходящих комплексов простетических групп включают в себя стрептавидин/биотин и авидин/биотин; неограничивающие примеры подходящих флуоресцентных материалов включают в себя биотин, умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного материала включает в себя люминол; неограничивающие примеры биолюминесцентных материалов включают в себя люциферазу, люциферин и экворин; и примеры подходящего радиоактивного материала включают в себя радиоактивный ион металла, например, альфа-излучатели или другие радиоактивные изотопы, такие как, например, йод (131I, 125I, 123I, 121I), углерод (14C), сера (35S), тритий (3H), индий (115mIn, 113mIn, 112In, 111In) и технеций (99Tc, 99mTc), таллий (201Ti), галлий (68Ga, 67Ga), палладий (103Pd), молибден (99Mo), ксенон (133Xe), фтор (18F), 153Sm, Lu (177Lu), 159Gd, 149Pm, 140La, 175Yb, 166Ho, 90Y, 47Sc, 86R, 188Re, 142Pr, 105Rh, 97Ru, 68Ge, 57Co, 65Zn, 85Sr, 32P, 153Gd, 169Yb, 51Cr, 54Mn, 75Se, цирконий (^{89}Zr) и олово (113Sn, 117Sn). Согласно некоторым вариантам осуществления радиоактивная метка может быть выбрана из группы, состоящей из: ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{68}Ga, ^{177}Lu, ^{18}F и ^{89}Zr. Согласно некоторым

вариантам осуществления применимые метки представляют собой изотопы, излучающие позитроны, которые могут быть обнаружены с помощью позитронно-эмиссионной томографии. Обнаруживаемое вещество может быть соединено или конъюгировано либо непосредственно с антителами согласно настоящему раскрытию, которые специфически связываются с комплексом GARP-proTGFβ1, комплексом LTBP1-proTGFβ1, комплексом LTBP3-proTGFβ1 и/или комплексом LRRC33-proTGFβ1, либо опосредованно через промежуточное соединение (такое как, например, линкер) с использованием подходящих методик. Любые из представленных в настоящем документе антител, которые конъюгированы с обнаруживаемым веществом, могут использоваться для любых подходящих диагностических анализов, таких как описанные в настоящем документе.

[464] Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие части согласно настоящему раскрытию также могут быть модифицированы лекарственным средством. Лекарственное средство может быть соединено или конъюгировано либо непосредственно с полипептидами согласно настоящему раскрытию, либо опосредованно, через промежуточное соединение (такое как, например, линкер (например, расщепляемый линкер)) с использованием подходящих методик.

Нацеливающие средства

[465] Согласно некоторым вариантам осуществления способы согласно настоящему раскрытию предусматривают использование одного или нескольких нацеливающих средств для нацеливания антитела или его антигенсвязывающей части, как описано в настоящем документе, на конкретный сайт у субъекта с целью модуляции высвобождения зрелого TGFβ из комплекса GARP-proTGFβ1, комплекса LTBP1-proTGFβ1, комплекса LTBP3-proTGFβ1 и/или комплекса LRRC33-proTGFβ1. Например, комплексы LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ1, как правило, локализуются во внеклеточном матриксе. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, могут быть конъюгированы с нацеливающими средствами внеклеточного матрикса с целью локализации антител в сайтах, где расположены LTBP-ассоциированные комплексы TGFβ1. Согласно таким вариантам осуществления селективное нацеливание антител приводит к селективной модуляции комплексов LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления средства, нацеленные на внеклеточный матрикс, включают в себя средства, связывающие гепарин, средства, связывающие металлопротеиназу матрикса, домены, связывающие лизилоксидазу, средства, связывающие фибриллин, средства, связывающие гиалуроновую кислоту, и другие.

[466] Аналогичным образом комплексы GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1, как правило, локализуются и прикрепляются к поверхности клеток. Первый экспрессируется на активированных FOXP3+ регуляторных Т-клетках (Treg), тогда как последний экспрессируется на определенных миелоидных клетках и некоторых раковых клетках, таких как AML. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, могут быть конъюгированы со средствами, связывающими иммунные клетки (например, Treg-клетки, активированные макрофаги и т.д.), с целью локализации антител в сайтах, где находятся эти ассоциированные с клетками комплексы proTGFβ1. Согласно таким вариантам осуществления селективное нацеливание антител приводит к селективному ингибированию ассоциированных с клеткой комплексов proTGFβ1 (например, селективное ингибирование высвобождения зрелого TGFβ1 в целях иммуномодуляции, например, при лечении рака). Согласно таким вариантам осуществления средства нацеливания на иммунные клетки могут включать в себя, например, белки CCL22 и CXCL12 или их фрагменты.

[467] Согласно некоторым вариантам осуществления могут использоваться биспецифические антитела, содержащие первую часть, которая селективно связывает комплекс proTGFβ1, и вторую часть, которая селективно связывает компонент целевого сайта, например, компонент ECM (например, фибриллин) или компонент Treg-клетки (например, CTLA-4).

[468] Как далее подробно описано в настоящем документе, настоящее изобретение предусматривает, что селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, можно использовать для стимуляции или восстановления гемопоэза в костном мозге. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления композиция, содержащая такой ингибитор (например, высокоаффинный, селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1), может быть нацелена на костный мозг. Одним из способов достижения нацеливания на костный мозг является использование определенных носителей, которые предпочтительно нацелены на локализацию или накопление в костном мозге. Например, можно использовать определенные носители на основе наночастиц со свойствами нацеливания на костный мозг, например наночастицы на основе липидов или липосомы. См., например, Sou (2012) “Advanced drug carriers targeting bone marrow”, публикация ResearchGate 232725109.

[469] Согласно некоторым вариантам осуществления нацеливающие средства включают в себя иммуностимуляторы, такие как адъюванты, содержащие сквален и/или α-токоферол, и адъюванты, содержащие лиганд/агонист TLR (такие как лиганды/агонисты TLR3). Например, адъювант, содержащий сквален, может предпочтительно нацеливаться

на определенные иммунные клетки, такие как моноциты, макрофаги и антигенпрезентирующие клетки, для усиления прайминга, процессинга антигена и/или дифференцировки иммунных клеток для усиления иммунитета хозяина. Согласно некоторым вариантам осуществления такой адъювант может стимулировать иммунные ответы хозяина на неоэпитопы для активации Т-клеток.

Терапевтические мишени и механизмы действия *in vivo*

[470] Соответственно, описанные в настоящем документе высокоаффинные, селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 можно использовать для ингибирования TGFβ1 в любых подходящих биологических системах, таких как системы in vitro, ex vivo и/или in vivo. Родственные способы могут предусматривать приведение в контакт биологической системы с ингибитором TGFβ1. Биологическая система может представлять собой аналитическую систему, биологический образец, культуру клеток и так далее. В некоторых случаях эти способы предусматривают модификацию содержания свободного фактора роста в биологической системе.

[471] Соответственно, такие фармацевтические композиции и составы можно использовать для нацеливания на TGFβ-содержащие латентные комплексы, доступные ингибиторам in vivo. Таким образом, антитело согласно настоящему изобретению предназначено для нацеливания на следующие комплексы в месте заболевания (например, TME), где оно упреждающе связывает латентный комплекс, тем самым предотвращая высвобождение фактора роста: i) proTGFβ1, презенированный GARP; ii) proTGFβ1, презенированный LRRC33; iii) proTGFβ1, презенированный LTBP1; и iv) proTGFβ1, презенированный LTBP3. Как правило, комплексы (i) и (ii), указанные выше, присутствуют на поверхности клетки, поскольку и GARP, и LRRC33 являются трансмембранными белками, способными закреплять или связывать латентный proTGFβ1 на внеклеточной поверхности клетки, экспрессирующей LRRC33, в то время как комплексы (iii) и (iv) являются компонентами внеклеточного матрикса. Таким образом, предусмотренные в настоящем документе ингибиторы устраняют необходимость полного связывания с эндогенными рецепторами с высокой аффинностью для оказания ингибирующих эффектов. Более того, нацеливание перед взаимодействием лиганд/рецептор может обеспечить более длительные эффекты, поскольку окно доступности мишени длиннее и более локализовано в соответствующих тканях, чем у общепринятых ингибиторов, которые нацелены на временные растворимые факторы роста только после того, как они высвобождаются из латентного комплекса. Таким образом, нацеливание на латентный комплекс, привязанный к определенным нишам, может способствовать лучшему взаимодействию с мишенью in

vivo по сравнению с обычными нейтрализующими антителами, которые должны конкурировать за связывание с эндогенными рецепторами в течение своего короткого периода полужизни в виде растворимого (свободного) фактора роста, например ~ двух минут, как только он высвобождается из латентного комплекса.

[472] Ряд исследований пролили свет на механизмы активации TGFβ1. Было продемонстрировано, что три интегрина, αVβ6, αVβ8, и αVβ1, являются ключевыми активаторами латентного TGFβ1 (Reed, N.I., et al., Sci Transl Med, 2015. 7(288): p. 288ra79; Travis, M.A. and D. Sheppard, Annu Rev Immunol, 2014. 32: p. 51-82; Munger, J.S., et al., Cell, 1999. 96(3): p. 319-28). Интегрины αV связывают последовательность RGD, присутствующую в LAP TGFβ1 и TGFβ1, с высокой аффинностью (Dong, X., et al., Nat Struct Mol Biol, 2014. 21 (12): p. 1091-6). Трансгенные мыши с мутацией в сайте TGFβ1 RGD, которая предотвращает связывание интегрина, но не секрецию, фенокопируют TGFβ1-/- мышь (Yang, Z., et al., J Cell Biol, 2007. 176(6): p. 787-93). Мыши, у которых отсутствуют интегрины β6 и β8, воспроизводят все основные фенотипы мышей с нокаутом TGFβ1 и TGFβ3, включая в себя полиорганное воспаление и волчью пасть, подтверждая важную роль этих двух интегринов в активации TGFβ1 в развитии и гомеостазе (Aluwihare, P., et al., J Cell Sci, 2009. 122(Pt 2): p. 227-32). Ключом к интегрин-зависимой активации латентного TGFβ1 является ковалентная связь с презентирующими молекулами; разрушение дисульфидных связей между GARP и TGFβ1 LAP в результате мутагенеза не нарушает образование комплекса, но полностью отменяет активацию TGFβ1 с помощью αVβ6 (Wang, R., et al., Mol Biol Cell, 2012. 23(6): p. 1129-39). Недавнее исследование структуры латентного TGFβ1 проливает свет на то, как интегрины обеспечивают высвобождение активного TGFβ1 из латентного комплекса: ковалентная связь латентного TGFβ1 с его презентирующей молекулой закрепляет латентный TGFβ1 либо в ECM через LTBP, либо в цитоскелете через GARP или LRRC33. Связывание интегрина с последовательностью RGD приводит к зависимому от силы изменению структуры LAP, позволяя активному TGFβ1 высвобождаться и связываться с соседними рецепторами (Shi, M., et al., Nature, 2011. 474(7351): p. 343-9). Важность интегрин-зависимой активации TGFβ1 при заболевании также хорошо подтверждена. Низкомолекулярный ингибитор αVβ1 защищает от индуцированного блеомицином фиброза легких и фиброза печени, индуцированного четыреххлористым углеродом (Reed, N.I., et al., Sci Transl Med, 2015. 7(288): p. 288ra79), и блокада αVβ6 с помощью антитела или потеря экспрессии интегрина β6 подавляют индуцированный блеомицином фиброз легких и индуцированный облучением фиброз (Munger, J.S., et al., Cell, 1999. 96(3): p. 319-28); Horan, G.S., et al., Am J Respir Crit Care Med, 2008. 177(1): p. 56-65).

[473] Помимо интегринов, были задействованы и другие механизмы активации TGFβ1, включая в себя тромбоспондин-1 и активацию протеазами, такими как плазмин, матриксные металлопротеиназы (MMP, например, MMP2, MMP9 и MMP12), катепсин D, калликреин и семейство ADAM цинковых протеаз (например, ADAM10, ADAM12 и ADAM17). Нокаут тромбоспондина-1 воспроизводит некоторые аспекты фенотипа TGFβ1-/- в некоторых тканях, но не защищает от индуцированного блеомицином фиброза легких, который, как известно, зависит от TGFβ (Ezzie, M.E., et al., Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. 44(4): p. 556-61). Кроме того, нокаут протеаз-кандидатов не приводил к фенотипу TGFβ1 (Worthington, J.J., J.E. Klementowicz, and M.A. Travis, Trends Biochem Sci, 2011. 36(1): p. 47-54). Это можно объяснить дублированием или тем, что эти механизмы имеют решающее значение при определенных заболеваниях, а не в развитии и гомеостазе.

[474] Таким образом, высокоаффинные специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, описанные в настоящем документе, включают в себя ингибиторы, которые действуют, предотвращая стадию активации TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы могут ингибировать интегрин-зависимую (например, механическую или принудительную) активацию TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы могут ингибировать протеазозависимую или индуцированную протеазой активацию TGFβ1. Последняя включает в себя ингибиторы, которые ингибируют стадию активации TGFβ1 интегрин-независимым образом. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы могут ингибировать активацию TGFβ1 независимо от режима активации, например, ингибировать как интегрин-зависимую активацию, так и протеазозависимую активацию TGFβ1. Неограничивающие примеры протеаз, которые могут активировать TGFβ1, включают в себя сериновые протеазы, такие как калликреины, хемотрипсин, трипсин, эластазы, плазмин, а также цинковые металлопротеазы (семейство MMP), такие как MMP-2, MMP-9 и MMP-13. Калликреины включают в себя калликреины плазмы и калликреины тканей, такие как KLK1, KLK2, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK9, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13, KLK14 и KLK15. Представленные в настоящем документе данные демонстрируют примеры специфических в отношении изоформы ингибиторов TGFβ1, способных ингибировать калликреин-зависимую активацию TGFβ1 in vitro. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы согласно настоящему изобретению предотвращают высвобождение или диссоциацию активного (зрелого) фактора роста TGFβ1 из латентного комплекса. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы могут работать за счет стабилизации неактивной (например, латентной) конформации комплекса. Данные также демонстрируют, что высокоаффинный, контекстно-независимый ингибитор

TGFβ1 (Ab6) также может ингибировать плазмин-зависимую активацию TGFβ1. Однако неожиданно оказалось, что ингибитор TGFβ1 (Ab3), зависящий от контекста, не смог ингибировать этот процесс. И Ab3, и Ab6 имеют сходные аффинности к матрикс-ассоциированным комплексам proTGFβ1. Однако Ab3 имеет значительно более слабую аффинность связывания с ассоциированными с клетками комплексами proTGFβ1. Относительная разница между двумя категориями составляет более 20 раз («смещение»). Для сравнения Ab6 показывает одинаково высокие аффинности к обеим категориям антигенных комплексов. Одно из возможных объяснений состоит в том, что наблюдаемое функциональное различие может происходить из-за смещения, которым характеризуется Ab3. Другое возможное объяснение заключается в том, что это опосредовано различиями в эпитопах или областях связывания.

[475] Изобретение особенно применимо для терапевтического применения при определенных заболеваниях, которые связаны с множеством биологических ролей передачи сигналов TGFβ1, которые не ограничиваются одним контекстом функции TGFβ1. В таких ситуациях может быть благоприятным подавление эффектов TGFβ1 в различных контекстах. Таким образом, в настоящем раскрытии представлены способы нацеливания и ингибирования TGFβ1 специфическим для изоформы способом, а не контекстно-специфическим способом. Такие средства могут называться «специфическими в отношении изоформы, контекстно-независимыми» модуляторами TGFβ1.

[476] Совокупность доказательств поддерживает идею о том, что многие заболевания проявляют сложные нарушения передачи сигналов TGFβ, которые, вероятно, связаны с участием гетерогенных типов клеток, которые обеспечивают различные эффекты функции TGFβ, которые опосредуются его взаимодействиями с так называемыми презентирующими молекулами. Идентифицировано по меньшей мере четыре таких презентирующих молекулы, которые могут «презентировать» TGFβ в различных внеклеточных нишах, чтобы сделать возможным его активацию в ответ на местные стимулы. В одной категории TGFβ депонируется в ECM в ассоциации с презентирующими молекулами, ассоциированными с ECM, такими как LTBP1 и LTBP3, которые опосредуют активности TGFβ, ассоциированные с ECM. В другой категории TGFβ привязывается к поверхности иммунных клеток посредством таких презентирующих молекул, как GARP и LRRC33, которые опосредуют определенную иммунную функцию. Эти презентирующие молекулы демонстрируют дифференциальную экспрессию, локализацию и/или функцию в различных тканях и типах клеток, указывая на то, что запускающие события и результат активации TGFβ будут варьироваться в зависимости от микроокружения. Основываясь на представлении о том, что многие эффекты TGFβ могут взаимодействовать и способствовать

прогрессированию заболевания, терапевтические средства, которые могут противодействовать многим аспектам функции TGFβ, могут обеспечивать более значительную эффективность.

[477] Обоснование преимущественного использования *контекстно-независимых* ингибиторов TGFβ1 по сравнению с *зависимыми от контекста* ингибиторами TGFβ1 в качестве терапевтического средства для лечения определенных заболеваний (как более подробно описано в настоящем документе) включает в себя следующее:

[478] Работа, раскрытая в настоящем документе, подтверждает участие гетерогенных комплексов TGFβ1 в окружении заболевания и расширяет понимание лежащих в его основе механизмов, обеспечивая понимание улучшенного терапевтического подхода для ряда заболеваний.

[479] Было признано, что различные заболевания характеризуются гетерогенными популяциями клеток в качестве источников TGFβ1, которые в совокупности вносят вклад в патогенез и/или прогрессирование заболевания. Более чем один тип TGFβ1-содержащих комплексов («контекстов»), вероятно, сосуществует в одном и том же микроокружении заболевания. В частности, такие заболевания могут характеризоваться как компонентом ECM (или «матрикс») передачи сигналов TGFβ1, так и иммунным компонентом передачи сигналов TGFβ1. В таких ситуациях селективное нацеливание только на один контекст TGFβ1 (например, TGFβ1, ассоциированный с одним конкретным типом презентирующей молекулы) может обеспечить ограниченное облегчение. Таким образом, для терапевтического применения желательны антагонисты TGFβ1 с широким ингибированием. Ранее описанные ингибирующие антитела, которые широко нацелены на множественные латентные комплексы TGFβ1, демонстрировали искаженные профили связывания среди целевых комплексов. Таким образом, авторы настоящего изобретения поставили перед собой задачу идентифицировать более однородно ингибирующие антитела, которые селективно ингибируют активацию TGFβ1, независимо от конкретной презентирующей молекулы, связанной с ними. Было высказано предположение, что, в частности, для применений в иммунной онкологии благоприятно сильно ингибировать как ассоциированный с матриксом TGFβ1, так и ассоциированный с иммунными клетками TGFβ1.

[480] Во-вторых, между стромой опухоли и фиброзными тканями наблюдается заметное сходство в тканевых/клеточных характеристиках, подчеркивая общие механизмы, лежащие в основе различных показаний. Указывается на перекрестную связь между и среди: i) TGFβ1-зависимых профиброзных фенотипов; ii) TGFβ1-зависимых проопухолевых фенотипов; и iii) TGFβ-зависимых иммуносупрессивных фенотипов,

наблюдаемых при ряде патологических состояний. Таким образом, использование контекстно-независимых ингибиторов, которые широко действуют на многие из этих компонентов с эквивалентной эффективностью, может обеспечить оптимальные терапевтические эффекты при различных типах болезненных состояний. Например, клинические проявления первичного миелофиброза включают в себя аномальную пролиферацию определенных популяций клеток и фиброз в костном мозге.

[481] В-третьих, ряд доказательств повысил вероятность того, что TGFβ 1 может быть, по меньшей мере частично, ответственным за лекарственную устойчивость к противораковым методам лечения (таким как ингибиторы иммунных контрольных точек, противораковые вакцины, терапия на основе сконструированных иммунных клеток, химиотерапия, лучевая терапия и т.д.) наблюдается при многих типах рака (пациенты с раком). В некоторых случаях такая устойчивость оказывается присущей конкретному раку/типу опухоли в генетическом фоне пациента (как правило, называемая врожденной устойчивостью, первичной устойчивостью, присущей устойчивостью или присущей устойчивостью; эти термины используются в настоящем документе взаимозаменяемо). Такая устойчивость может быть представлена в подгруппе пациентов, плохо ответивших на терапию рака, такую как ингибиторы иммунных контрольных точек, и, возможно, отражает окружение с иммунным исключением. Вероятно, это опосредовано, по меньшей мере частично, TGFβ1-зависимым путем. Таким образом, описанный в настоящем документе селективный в отношении изоформы ингибитор может сделать устойчивые раковые опухоли более чувствительными к таким видам терапии. В частности, в ситуациях, когда устойчивость к терапии связана с иммунным исключением в месте заболевания (таком как опухоль), ингибирование TGFβ1 может разблокировать иммуносупрессию и позволить эффекторным клеткам получить доступ к своей мишени (например, к раковым клеткам). Тот же механизм действия применим во многих терапевтических парадигмах, где эффекты терапии должны вступать в контакт с заболеванием или «застрахованной» тканью, подлежащей лечению. Считается, что высокоаффинные, контекстно-независимые ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению облегчают этот процесс, работая через множество звеньев функции TGFβ1, например, ингибирование Treg, модуляцию макрофагов и регуляцию ECM, тем самым преодолевая лекарственную устойчивость.

[482] В качестве альтернативы со временем может развиться устойчивость, так что пациенты, проявляющие существенную клиническую восприимчивость к лечению, со временем становятся плохо ответившими (т.е. адаптивная или приобретенная устойчивость). Например, сообщалось, что терапия с помощью PD-1 может приводить к адаптивной устойчивости, которая коррелирует с активацией других Т-клеточных

антигенов (например, компонентов TCR), что позволяет предположить, что раковые клетки эволюционируют, чтобы избежать блокады PD-1 с помощью другого механизма. Впоследствии второй ингибитор контрольной точки, нацеленный на другой компонент рецептора Т-клеток, такой как TIM3, может восстановить чувствительность к иммунотерапии. Эти наблюдения предполагают, что блокирование множества путей для противодействия адаптивным ответам раковых клеток может снизить вероятность способности раковых клеток уклоняться от иммунитета хозяина. Ингибиторы TGFβ1, которые способны нацеленно воздействовать на множественные контексты TGFβ1, могут успешно обойти приобретенную лекарственную устойчивость, обеспечивая блокаду в нескольких точках функции TGFβ1.

[483] И, наконец, на основании представления о том, что экспрессия различных презентирующих молекул может изменяться с течением времени, например, в ответ на местные сигналы (например, цитокины, хемокины, среда ECM и т.д.) и/или с изменениями в микроокружении заболевания, предполагается, что селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, такие как те, что описаны в настоящем документе, могут быть использованы для противодействия такой пластичности и обеспечения широких, длительных ингибирующих эффектов, даже когда происходят аномальные изменения в экспрессии презентирующих молекул.

[484] В любом из этих сценариев контекстно-независимые ингибиторы TGFβ1 преимущественно нацелены на нацеливание на про/латентные формы TGFβ1 в ассоциации с различными презентирующими молекулами, все из которых или различные их комбинации присутствуют в микроокружении(ях) заболевания. Более конкретно, в одном варианте ингибитор нацелен на ассоциированный с ECM TGFβ1 (комплексы LTBP1/3-TGFβ1). В другом варианте ингибитор нацелен на ассоциированный с иммунными клетками TGFβ1. Это включает в себя презентированный GARP TGFβ1, такой как комплексы GARP-TGFβ1, экспрессируемые на клетках Treg, и комплексы LRRC33-TGFβ1, экспрессируемые на макрофагах и других миелоидных/лимфоидных клетках, а также на некоторых раковых клетках.

[485] Такие антитела включают в себя специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, которые связывают и предотвращают активацию (или высвобождение) зрелого фактора роста TGFβ1 из про/латентного комплекса TGFβ1 контекстно-независимым образом, так что антитела могут ингибировать активацию (или высвобождение) TGFβ1, ассоциированного с несколькими типами презентирующих молекул. В частности, настоящее изобретение относится к антителам, способным блокировать ассоциированный с ECM TGFβ1 (комплексы, презентированные LTBP и

LTBP3) и ассоциированный с клеткой TGFβ1 (комплексы, презентированные GARP и LRRC33).

[486] Было высказано предположение, что различные болезненные состояния характеризуются дисрегуляцией передачи сигналов TGFβ в качестве обусловливающего фактора. В самом деле, патогенез и/или прогрессирование определенных состояний человека, по-видимому, в основном управляется или зависит от активности TGFβ1. В частности, многие такие заболевания и нарушения характеризуются как компонентом ECM, так и иммунным компонентом функции TGFβ1, что позволяет предположить, что активация TGFβ1 задействована во множестве контекстов (например, опосредована более чем одним типом презентирующих молекул). Более того, предполагается, что существует перекрестное взаимодействие между TGFβ1-чувствительными клетками. В некоторых случаях взаимодействия между многогранными активностями ветки TGFβ1 могут запускать каскад событий, которые приводят к прогрессированию заболевания, обострению и/или подавлению способности хозяина бороться с заболеванием. Например, микроокружение при определенных заболеваниях, такое как микроокружение опухоли (TME) и фиброзное микроокружение (FME), может быть ассоциировано с TGFβ1, презентированным множеством различных презентирующих молекул, например, LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1, LRRC33-proTGFβ1 и любые их комбинации. Активности TGFβ1 одного контекста могут, в свою очередь, регулировать или влиять на активности TGFβ1 другого контекста, повышая вероятность того, что дисрегуляция может привести к обострению болезненных состояний. Следовательно, желательно широко ингибировать несколько режимов функции TGFβ1 (т.е. несколько контекстов), при этом селективно ограничивая такие ингибирующие эффекты изоформой TGFβ1. Цель состоит не в том, чтобы нарушить гомеостатическую передачу сигналов TGFβ, опосредованную другими изоформами, включая в себя TGFβ3, который играет важную роль в заживлении ран.

[487] Иммунные компоненты активности TGFβ1 в значительной степени опосредуются ассоциированным с клеткой TGFβ1 (например, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1). И GARP-, и LRRC33-ветви функции TGFβ1 ассоциированы с иммуносупрессивными свойствами, которые вносят вклад в прогрессирование многих заболеваний. Таким образом, высокоаффинный, селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1 можно использовать для ингибирования TGFβ1, ассоциированного с иммуносупрессивными клетками. Иммуносупрессивные клетки включают в себя регуляторные Т-клетки (Treg), макрофаги M2 и MDSC. Таким образом, ингибитор TGFβ1

может ингибировать или устранять иммуносупрессивный фенотип в очаге заболевания, например TME и FME in vivo.

[488] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ1 ингибирует TGFβ1, ассоциированный с клеткой, экспрессирующей комплекс GARP-TGFβ1 или комплекс LRRC33-TGFβ1, где необязательно клетка может представлять собой Т-клетку, фибробласт, миофибробласт, макрофаг, моноцит, дендритную клетку, антигенпрезентирующую клетку, нейтрофил, супрессорную клетку миелоидного происхождения (MDSC), лимфоцит, тучную клетку или микроглию. Т-клетка может представлять собой регуляторную Т-клетку (например, иммуносупрессивную Т-клетку). Нейтрофил может представлять собой активированный нейтрофил. Макрофаг может представлять собой активированный (например, поляризованный) макрофаг, включая в себя профибротические и/или ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM), например макрофаги подтипа M2c и подтипа M2d. Согласно некоторым вариантам осуществления макрофаги подвергаются действию факторов, происходящих из опухоли (например, цитокинов, факторов роста и т.д.), которые могут дополнительно индуцировать пораковые фенотипы в макрофагах. Согласно некоторым вариантам осуществления такой фактор, происходящий из опухоли, представляет собой CSF-1/M-CSF.

[489] Согласно некоторым вариантам осуществления клетка, экспрессирующая комплекс GARP-TGFβ1 или комплекс LRRC33-TGFβ1, представляет собой раковую клетку, например, циркулирующие раковые клетки и опухолевые клетки.

GARP-proTGFβ1 в качестве мишени

[490] Регуляторные Т-клетки (Treg) представляют собой небольшую подгруппу CD4-положительных Т-лимфоцитов и играют важную роль, выступая в качестве «разрыва» в подавлении иммунных ответов для поддержания гомеостаза. При болезненных состояниях (таких как рак) сообщается о повышенных уровнях Treg, что связано с более плохим прогнозом. Treg человека, выделенные из клеток периферической крови доноров, можно активировать с помощью стимуляции CD3/CD28. Показано, что активация Treg вызывает заметное увеличение экспрессии GARP-proTGFβ1 на поверхности клетки (фиг. 26A). Как сообщалось ранее, Treg проявляют иммуносупрессивную активность, которая включает в себя мощное подавление пролиферации эффекторных Т-клеток (Teff). Как показано в настоящем документе (фиг. 26B), в стандартных экспериментальных условиях, когда большинство Teff подвергаются клеточному делению, совместно культивируемые Treg уменьшают это количество до небольшой фракции. И это ингибирование с помощью Treg пролиферации Teff может быть эффективно преодолено (т.е. дезингибирование) путем

обработки совместной культуры Teff и Treg с селективными в отношении изоформы ингибиторами TGFβ1, демонстрируя, что селективный в отношении изоформы TGFβ1, описанный в настоящем документе, эффективен в ингибировании GARP-ветви функции TGFβ1. В окружении заболевания (таком как микроокружение опухоли и фиброзное окружение) это будет выражаться в способности этих ингибиторов блокировать опосредованную Treg иммуносупрессию. Это, в свою очередь, должно привести к усилению пролиферации эффекторных Т-клеток для повышения иммунитета. GARP-плечо селективных в отношении изоформы ингибиторов TGFβ1 может нацеливаться на этот аспект функции TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, как описано в настоящем документе, могут снижать супрессивную активность регуляторных Т-клеток (Treg).

LRRC33-proTGFβ1 в качестве мишени

[491] LRRC33 экспрессируется в селективных типах клеток, в частности в клетках миелоидного происхождения, включая в себя моноциты и макрофаги. Моноциты произошли от предшественников в костном мозге, циркулируют в кровотоке и достигают периферических тканей. Циркулирующие моноциты могут затем мигрировать в ткани, где они подвергаются воздействию местного окружения (например, тканеспецифической, ассоциированной с заболеванием и т.д.), что включает в себя набор различных факторов, таких как цитокины и хемокины, запускающих дифференцировку моноцитов в макрофаги, дендритные клетки и т.д. К ним относятся, например, альвеолярные макрофаги в легких, остеокласты в костном мозге, микроглия в ЦНС, гистиоциты в соединительных тканях, клетки Купфера в печени и макрофаги коричневой жировой ткани в коричневых жировых тканях. В солидной опухоли инфильтрированные макрофаги могут представлять собой ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM), ассоциированные с опухолью нейтрофилы (TAN) и супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) и т.д. Такие макрофаги могут активировать и/или быть ассоциированными с активированными фибробластами, такими как ассоциированные с карциномой (или ассоциированные с раком) фибробласты (CAF) и/или строма. Таким образом, описанные в настоящем документе ингибиторы активации TGFβ1, которые ингибируют высвобождение зрелого TGFβ1 из LRRC33-содержащих комплексов, могут нацеливаться на любую из этих клеток, экспрессирующих LRRC33-proTGFβ1 на поверхности клетки. В фиброзном микроокружении клетки, экспрессирующие LRRC33, могут включать в себя макрофаги M2, тканевые макрофаги и/или MDSC.

[492] Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LRRC33-TGFβ1 присутствует на внешней поверхности профибротических (M2-подобных) макрофагов. Согласно некоторым вариантам осуществления профибротические (M2-подобные) макрофаги присутствуют в фиброзном микроокружении. Согласно некоторым вариантам осуществления нацеливание комплекса LRRC33-TGFβ1 на внешнюю поверхность профибротических (M2-подобных) макрофагов обеспечивает лучший эффект по сравнению с нацеливанием только LTBP1-TGFβ1 и/или комплексов LTBP1-TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления M2-подобные макрофаги дополнительно поляризованы на несколько подтипов с различными фенотипами, такие как M2c и M2d TAM-подобные макрофаги. Согласно некоторым вариантам осуществления макрофаги могут активироваться различными факторами (например, факторами роста, хемокинами, цитокинами и молекулами ремоделирования ECM), присутствующими в микроокружении опухоли, включая в себя без ограничения TGFβ1, CCL2 (MCP-1), CCL22, SDF-1/CXCL12, M-CSF (CSF-1), IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, CXCR4, VEGF, PDGF, средства, регулирующие простагландины, такие как арахидоновая кислота и циклооксигеназа-2 (COX -2), белок, связанный с паратиреоидным гормоном (PTHrP), RUNX2, HIF1α и металлопротеиназы. Воздействие одного или нескольких из таких факторов может дополнительно привести к проопухолевым фенотипам моноцитов/макрофагов. В качестве лишь одного примера: было показано, что коэкспрессия CCL2 и VEGF в опухолях коррелирует с увеличением TAM и плохой диагностикой. В свою очередь, активированные ассоциированные с опухолью клетки могут также способствовать мобилизации и/или дифференцировке других клеток в проопухолевые клетки, например, CAF, TAN, MDSC и т.п. Стромальные клетки также могут реагировать на активацию макрофагов и влиять на ремоделирование ВКМ и, в конечном итоге, на васкуляризацию, инвазию и метастазирование. Например, CCL2 не только действует как аттрактант моноцитов, но также способствует клеточной адгезии за счет активации MAC-1, который является рецептором для ICAM-1, экспрессируемого в активированном эндотелии. Это может привести к CCL2-зависимому артериогенезу и прогрессированию рака. Таким образом, описанные в настоящем документе ингибиторы TGFβ1 можно использовать в способе ингибирования артериогенеза путем вмешательства в сигнальный каскад CCL2.

[493] Подмножество миелоидных клеток экспрессируют LRRC33 на клеточной поверхности, включая в себя M2-поляризованные макрофаги и супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC), причем оба типа обладают иммуносупрессивными фенотипами и ими обогащено окружение заболевания (например, TME и FME). Циркулирующие моноциты, происходящие из костного мозга, по-видимому, не

экспрессируют LRRC33 на клеточной поверхности. Ограничительная экспрессия LRRC33 делает это особенно привлекательной терапевтической мишенью. В то время как большинство исследований, доступных в литературе, сосредоточены на биологии эффекторных Т-клеток (например, цитотоксических клеток CD8+) при раке, растущие доказательства (такие как данные, представленные в настоящем документе) указывают на важную роль популяций супрессивных миелоидных клеток при заболеваниях. Важно отметить, что раскрытые в настоящем документе высокоселективные антитела, ингибирующие TGFβ1, способны нацеливаться на это ветку функции TGFβ1 in vivo. Более конкретно, данные, представленные в настоящем документе, показывают, что ассоциированные с опухолью макрофаги M2 и MDSC экспрессируют LRRC33 на клеточной поверхности, что сильно коррелирует с прогрессированием заболевания. Раскрытые в настоящем документе высокоаффинные, селективные по отношению к TGFβ1 антитела способны преодолевать первичную устойчивость опухолей к терапии блокадой контрольных точек (CBT) на множестве фармакологических моделей. Действительно, противоопухолевая эффективность совпадает со значительным снижением уровней ассоциированных с опухолью макрофагов и MDSC, предполагая, что нацеливание на этот аспект функции TGFβ1 может способствовать терапевтически благоприятным эффектам. Это, вероятно, применимо к другому заболеванию, которое характеризуется повышенными уровнями этих иммуносупрессивных клеток. Ряд фиброзных состояний также связан с повышенной локальной частотой встречаемости этих популяций клеток. Таким образом, ожидается, что высокоаффинные, селективные по отношению к TGFβ1 антитела будут оказывать аналогичные эффекты in vivo при таких показаниях.

LTBP1/3-proTGFβ1 в качестве мишени

[494] Внеклеточный матрикс представляет собой место, где координируются сложные сигнальные события на клеточном, тканевом, органном и системном уровнях. Дисрегуляция ECM наблюдается при ряде патологий. Резервуар фактора роста TGFβ1 присутствует в ECM в форме латентного комплекса proTGFβ1. Латентные комплексы proTGFβ1 прикрепляются к матриксу посредством ковалентных взаимодействий с компонентами ECM, LTBP1 и/или LTBP3. Другие белки ECM, такие как фибронектин и фибриллины (например, фибриллин-1), как полагают, играют важную роль в опосредовании отложения LTBP и локализации LTBP в ECM. Нацеливание LLC на ECM является важным шагом в процессе активации TGFβ1. Поскольку большинство, если не все, показания, связанные с TGFβ1, вероятно, связаны с некоторыми аспектами функции ECM, которые зависят от TGFβ1, крайне важно, чтобы ингибиторы TGFβ, рассматриваемые в

терапевтических целях, были способны воздействовать на этот пул передачи сигналов TGFβ1. Действительно, высокоаффинные, селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему раскрытию демонстрируют чрезвычайно высокие аффинности и эффективность в отношении комплексов LTBP1/3-proTGFβ1 человека. Поскольку эти антитела непосредственно нацелены на комплексы, локализованные в ECM в их преактивационном состоянии, этот механизм действия устранит необходимость конкуренции с эндогенными рецепторами с высокой аффинностью за связывание лиганда. Кроме того, поскольку ингибирующая активность этих антител локализована в месте заболевания, ассоциированного с повышенной активацией TGFβ1 (например, ниша с дисрегуляцией внутри ECM), предполагается, что эти антитела должны достичь повышенной эффективности при ограничении побочных эффектов.

[495] Согласно некоторым вариантам осуществления комплекс LTBP1-TGFβ1 или комплекс LTBP3-TGFβ1 является компонентом внеклеточного матрикса. N-конец LTBP может быть ковалентно связан с ECM через изопептидную связь, образование которой может катализироваться трансглутаминазами. Считается, что структурная целостность ECM важна для опосредования LTBP-ассоциированной активности TGFβ1. Например, жесткость матрикса может существенно влиять на активацию TGFβ1. Кроме того, включение фибронектина и/или фибриллина в каркас может значительно увеличить LTBP-опосредованную активацию TGFβ1. Точно так же присутствие фибронектина и/или фибриллина в анализах LTBP (например, анализах эффективности на основе клеток) может увеличивать окно анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления внеклеточный матрикс содержит фибриллин и/или фибронектин. Согласно некоторым вариантам осуществления внеклеточный матрикс содержит белок, содержащий мотив RGD.

[496] Таким образом, высокоаффинные, селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, представленные в настоящем документе, обеспечивают эффективное ингибирование каждого из биологических контекстов функции TGFβ1, а именно, GARP-плеча, LRRC33-плеча и LTBP1/3-плеча.

Выбор терапевтических показаний и/или субъектов, которые, вероятно, будут отвечать на терапию, содержащую TGFβ1-селективное, высокоаффинное, в широком диапазоне ингибирующее средство

[497] Можно сделать три исследования относительно идентификации/скрининга/выбора подходящих показаний и/или популяций пациентов, для которых высокоаффинные, специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, вероятно, будут иметь терапевтические

эффекты: i) вызвано ли заболевание или зависит ли оно преимущественно от изоформы TGFβ1 по сравнению с другими изоформами у человека (или по меньшей мере в кодоминантно); ii) связано ли состояние (или пораженная ткань) с иммуносупрессивным фенотипом; и iii) характеризуется ли заболевание как ассоциированной с матриксом, так и ассоциированной с клетками функцией TGFβ1.

[498] Дифференциальная экспрессия трех известных изоформ TGFβ, а именно TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3, наблюдалась как при нормальных (здоровых; гомеостатических), так и при болезненных состояниях в различных тканях. Тем не менее, концепция селективности в отношении изоформ не была полностью использована и надежно достигнута с помощью традиционных подходов, которые содействуют неселективному ингибированию TGFβ среди множества изоформ. Более того, профили экспрессии изоформ могут по-разному регулироваться не только при нормальных (гомеостатических) и аномальных (патологических) состояниях, но также в различных субпопуляциях пациентов. Поскольку большинство доклинических исследований проводится на ограниченном количестве моделей животных, которые могут воспроизводить или не воспроизводить состояния человека, данные, полученные с использованием таких моделей, могут быть смещенными, что приведет к неправильной интерпретации данных или неверным выводам относительно возможности интерпретации полученных данных применительно к человеку для целей разработка терапевтических средств.

[499] Соответственно, настоящее изобретение включает признание того факта, что дифференциальную экспрессию изоформ TGFβ в доклинических моделях на животных следует принимать во внимание при прогнозировании эффективности конкретных лекарственных препаратов-кандидатов (например, ингибиторов TGFβ1), а также при интерпретации доклинических данных в отношении возможности интерпретации полученных данных применительно к состояниям человека.

[500] Предыдущие анализы образцов опухолей человека показали, что передача сигналов TGFβ является важным фактором первичной устойчивости к прогрессированию заболевания и ответу на лечение, включая в себя терапию блокадой контрольных точек («CBT») для различных типов злокачественных новообразований. Исследования, опубликованные в литературе, показывают, что экспрессия гена TGFB может иметь особое значение для устойчивости к лечению, предполагая, что активность этой изоформы может управлять передачей сигналов TGFβ при этих заболеваниях. Как подробно описано в примере 11, для большинства типов опухолей человека, представленных в Атласе ракового генома (TCGA), экспрессия TGFB1, по-видимому, является наиболее распространенной, что позволяет предположить, что выбор доклинических моделей, которые более точно

воспроизводят профили экспрессии изоформ TGFβ при заболеваниях человека, может быть полезным.

[501] Как проиллюстрировано в настоящем документе, TGFβ1 и TGFβ3 являются кодоминантными (коэкспрессируются на аналогичных уровнях) в некоторых моделях сингенного рака у мышей (например, EMT-6 и 4T1), которые широко используются в доклинических исследованиях (см. фиг. 20D). Напротив, множество других моделей рака (например, S91, B16 и MBT-2) экспрессируют почти исключительно TGFβ1, аналогично тому, что наблюдается во многих опухолях человека, в которых TGFβ1, по-видимому, чаще является доминирующей изоформой по сравнению с TGFβ2/3 (см. фиг. 20B и 20C). Кроме того, изоформа(ы) TGFβ, преимущественно экспрессируемая(ые) в гомеостатических условиях, может(могут) не быть изоформой(ами), ассоциированной(ыми) с заболеванием. Например, в нормальных тканях легких у здоровых крыс тоническая передача сигналов TGFβ, по-видимому, опосредуется главным образом TGFβ3. Тем не менее, TGFβ1, по-видимому, заметно положительно регулируется при болезненных состояниях, таких как фиброз легких. Вместе взятые, хотя это и не является предварительным условием, может быть полезно протестировать или подтвердить относительную экспрессию изоформ TGFβ в клинических образцах, чтобы выбрать подходящие терапевтические средства, на которые пациент, вероятно, ответит. Согласно некоторым вариантам осуществления определение относительной экспрессии изоформы может быть выполнено после лечения. В таких обстоятельствах реакция пациентов (например, клинический ответ/эффект) в ответ на терапию ингибированием TGFβ1 может коррелировать с относительными уровнями экспрессии изоформ TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления избыточная экспрессия изоформы TGFβ1, показанная *ex post facto*, коррелирует с большей реакцией на лечение.

[502] Как описано в настоящем документе, селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 особенно благоприятны для лечения заболеваний, при которых изоформа TGFβ1 экспрессируется преимущественно по сравнению с другими изоформами (например, называемых TGFβ1-доминантными). В качестве примера неограничивающий список клинических образцов рака человека с относительными уровнями экспрессии TGFB1 (слева), TGFB2 (в центре) и TGFB3 (справа) представлен на фиг. 20B и 20C. Каждая горизонтальная линия в трех изоформах представляет одного пациента. Как можно видеть, общая экспрессия TGFβ1 (TGFB1) значительно выше в большинстве этих опухолей/раковых заболеваний человека, чем у двух других изоформ во многих типах опухолей/рака, что позволяет предположить, что TGFβ1-селективное ингибирование может быть благоприятным при этих типах заболеваний. Взятые вместе, эти данные

подтверждают мнение о том, что селективное ингибирование активности TGFβ1 может преодолеть первичную устойчивость к СВТ. Создание высокоселективных ингибиторов TGFβ1 также позволит оценить, решит ли такой подход ключевые проблемы безопасности, наблюдаемые при неселективном в отношении TGFβ ингибировании, что будет важно для оценки их терапевтической применимости.

[503] Однако следует отметить некоторые исключения. Во-первых, такая тенденция не всегда применима к отдельным пациентам в рамках данного типа заболевания. Т.е. даже при типе рака, который демонстрирует *почти* равномерное преобладание TGFβ1 над TGFβ2/3 в целом, есть несколько индивидуумов, которые не следуют этому общему правилу, как показано на фиг. 20C. Таким образом, пациенты, относящиеся к субпопуляции меньшинства, могут не отвечать на терапию ингибиторами, специфическими в отношении изоформы TGFβ1, так, как это работает для большинства пациентов. Во-вторых, существует несколько типов рака, при которых TGFβ1 является *кодоминантным* с другой изоформой или при которых экспрессия TGFβ2 и/или TGFβ3 значительно выше, чем TGFβ1. В таких ситуациях TGFβ1-селективные ингибиторы, такие как описанные в настоящем документе, вряд ли будут эффективными при использовании по отдельности. Скорее, подходящий(е) дополнительный(е) ингибитор(ы), нацеленный(е) на другую изоформу(ы), можно использовать в сочетании (см., например, WO 2016/201282). Однако для управления потенциально серьезной токсичностью следует избегать применения неселективных ингибиторов TGFβ, а также ингибиторов, которые противодействуют как TGFβ2, так и TGFβ3.

[504] Например, при заболеваниях (таких как определенные типы карциномы и саркомы) или у отдельных пациентов, где TGFβ1 является кодоминантным (например, коэкспрессируется на аналогичных уровнях) с TGFβ3 (например, как показывает анализ биопсии), подходящая схема лечения может включать в себя как ингибитор TGFβ1, так и ингибитор TGFβ3. Предпочтительно, каждый из ингибиторов является селективным в отношении изоформы ингибитором, чтобы избежать нежелательных побочных эффектов или токсичности, ассоциированных с неселективным ингибированием всех изоформ TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления один или оба селективных в отношении изоформы ингибитора ингибируют стадию активации изоформы TGFβ (например, TGFβ1 и/или TGFβ3). Согласно предпочтительным вариантам осуществления селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1 представляет собой высокоаффинный, контекстно-независимый ингибитор активации, такой как описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ3 представляет собой контекстно-независимый ингибитор

активации TGFβ3, полученный способом, предусматривающий стадию выбора антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связывают комплекс proTGFβ3. Как правило, такой способ дополнительно предусматривает отбор или подтверждение способности антитела или фрагмента связывать множественные антигенные комплексы, например, LTBP1-proTGFβ3, LTBP3-proTGFβ3, GARP-proTGFβ3 и/или LRRC33-proTGFβ3. Предпочтительно такой способ дополнительно предусматривает отбор или подтверждение способности антитела или фрагмента ингибировать высвобождение фактора роста (TGFβ3) из латентного комплекса (т.е. ингибирование активации).

[505] Когда подходящие схемы лечения включают два селективных в отношении изоформы ингибитора TGFβ, такие как TGFβ1 и TGFβ3 (как в приведенном выше примере), такая терапия может включать в себя единый состав, который включает в себя ингибиторы как TGFβ1, так и TGFβ3. Такой состав может содержать, например, 10-50 мг/мл каждого ингибитора и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

[506] Альтернативно, такая терапия может предусматривать использование двух отдельных составов, каждый из которых содержит один ингибитор, для введения пациенту или популяции пациентов. Это обеспечивает дополнительную гибкость в регулировании соотношений дозировок двух ингибитора, вводимых пациенту или популяции пациентов, в зависимости от относительных уровней экспрессии (выше нормальных уровней) двух изоформ TGFβ, присутствующих в одном или нескольких биологических образцах, собранных от пациента или популяции пациентов. Например, для лечения TGFβ1-положительного, TGFβ3-положительного рака/опухолей (например, рака молочной железы), где первая является доминирующей изоформой, ассоциированной с заболеванием, по сравнению с последней, ингибитор TGFβ1 может использоваться в более высоких дозах и/или с большей продолжительностью в рамках схем лечения.

[507] Следовательно, полезно тестировать или подтверждать относительные уровни экспрессии трех изоформ TGFβ (т.е. TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3) в клинических образцах, собранных от отдельных пациентов. Такая информация может обеспечить лучший прогноз эффективности конкретной терапии для отдельных пациентов или популяций пациентов, что может помочь обеспечить выбор соответствующей схемы лечения (например, индивидуализированного/персонализированного лечения), чтобы повысить вероятность клинического ответа.

[508] Совсем недавно авторы настоящей заявки сделали неожиданное открытие, что высокоаффинный TGFβ1-селективный ингибитор (например, Ab6), используемый в

сочетании с ингибитором контрольной точки (например, антителом к PD-1), способен вызывать значительную регрессию опухоли в модели EMT-6, которая, как известно, экспрессирует как TGFβ1, так и TGFβ3 на аналогичных уровнях. Кодоминирование было подтверждено как измерениями РНК, так и анализами ELISA (см. фиг. 35). Это наблюдение является неожиданным, поскольку ранее предполагалось, что для достижения материальной эффективности в TGFβ1-положительных, TGFβ3- положительных опухолях в контексте блокады контрольных точек необходимо специфически ингибировать обе кодоминантные изоформы. Однако неожиданно оказалось, что одного TGFβ1-селективного ингибитора (в сочетании с антителом к PD-1) без TGFβ3-селективного ингибитора достаточно для преодоления первичной устойчивости к СВТ и достижения эффективности in vivo в уменьшении объема опухоли и увеличении выживаемости (см. пример 18). Не привязываясь к какой-либо конкретной теории, это может быть связано с тем, что TGFβ1 является действительно вызывающей заболевание изоформой, хотя TGF3 коэкспрессируется в опухоли. Другая возможность заключается в том, что ингибирование TGFβ1 вызывает отрицательную регуляцию TGFβ3 ниже в каскаде. Также возможно, что две изоформы подвержены различающейся временной и/или пространственной регуляции. Например, две изоформы могут быть локализованы в отдельных клеточных или тканевых компартментах. Дополнительно или в качестве альтернативы остается возможным, что мощный ингибитор TGFβ1, используемый в сочетании с ингибитором контрольной точки, может быть достаточным для преодоления иммуносупрессивного порога. Соответственно, настоящее изобретение включает в себя использование ингибитора TGFβ1 для стимуляции регрессии опухоли, где опухоль является TGFβ1+/TGFβ3+. Такая опухоль может включать в себя, например, рак эпителиального происхождения, т.е. карциному (например, базальноклеточную карциному, плоскоклеточную карциному, почечно-клеточную карциному, протоковую карциному in situ (DCIS), инвазивную протоковую карциному и аденокарциному). Согласно некоторым вариантам осуществления TGFβ1 является преимущественно изоформой, ассоциированной с заболеванием, тогда как TGFβ3 поддерживает гомеостатическую функцию в ткани, такой как эпителий.

[509] Некоторые опухоли, такие как различные карциномы, можно охарактеризовать как опухоли с низкой мутационной нагрузкой (MBT). Такие опухоли часто являются слабо иммуногенными и не вызывают достаточного Т-клеточного ответа. Лечение рака, которое включает в себя химиотерапию, лучевую терапию, противораковые вакцины и/или онколитический вирус, может быть полезным для индукции Т-клеточного иммунитета в таких опухолях. Следовательно, терапия ингибированием TGFβ1, подробно описанная в настоящем документе, может использоваться в сочетании с одним или

несколькими из этих способов лечения рака для усиления противоопухолевых эффектов. По сути, такая комбинированная терапия направлена на превращение «холодных» опухолей (например, слабо иммуногенных опухолей) в «горячие» опухоли путем стимулирования неоантигенов и облегчения атаки эффекторных клеток на опухоль. Примеры таких опухолей включают в себя рак молочной железы, рак яичников и рак поджелудочной железы, например, протоковую аденокарциному поджелудочной железы (PDAC). Соответственно, любое одно или несколько антител или их фрагментов, описанных в настоящем документе, можно использовать для лечения слабо иммуногенной опухоли («холодной опухоли»), сенсибилизированной с помощью терапии рака, направленной на усиление Т-клеточного иммунитета.

[510] В опухолях с иммунным исключением, где эффекторные Т-клетки держатся вдали от места опухоли (следовательно, «не допущены»), иммуносупрессивное окружение опухоли может опосредоваться TGFβ1-зависимым образом. Это опухоли, которые, как правило, являются иммуногенными; однако Т-клетки не могут в достаточной степени инфильтрировать, пролиферировать и вызывать свои цитотоксические эффекты из-за иммуносупрессивного окружения. Как правило, такие опухоли плохо отвечают на терапию рака, например, с помощью CBT. Как показывают данные, представленные в настоящем документе, дополнительная терапия, содержащая ингибитор TGFβ1, может преодолеть иммуносупрессивный фенотип, обеспечивая возможность инфильтрации, пролиферации Т-клеток и противоопухолевой функции, тем самым делая такую опухоль более чувствительной к терапии рака, такой как CBT.

[511] Таким образом, второе исследование направлено на идентификацию или отбор пациентов с иммуносупрессивной(ыми) опухолью(ями), которым может помочь терапия ингибитором TGFβ1. Присутствие или степень частот встречаемости эффекторных Т-клеток в опухоли указывает на противоопухолевый иммунитет. Следовательно, обнаружение в опухоли противоопухолевых клеток, таких как клетки CD8+, дает полезную информацию для оценки того, может ли пациент получить положительный результат от терапии CBT и/или ингибитором TGFβ1.

[512] Обнаружение можно проводить известными способами, такими как иммуногистохимический анализ образцов биопсии опухоли. Совсем недавно были разработаны неинвазивные способы визуализации, которые позволят обнаруживать представляющие интерес клетки (например, цитотоксические Т-клетки) in vivo. См., например, http://www.imaginab.com/technology/; Tavare et al. (2014) PNAS, 111(3): 1108-1113; Tavare et al. (2015) J Nucl Med 56(8): 1258-1264; Rashidian et al. (2017) J Exp Med 214(8): 2243-2255; Beckford Vera et al. (2018) PLoS ONE 13(3): e0193832; и Tavare et al. (2015) Cancer

Res 76(1): 73-82, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки. Как правило, антитела или антителоподобные молекулы, созданные с помощью обнаруживающего фрагмента (например, радиоактивной метки), могут быть введены пациенту с помощью инфузии, затем они будут распространяться и локализоваться в сайтах конкретного маркера (например, CD8+). Таким образом можно определить, имеет ли опухоль фенотип иммуной эксклюзии. Если установлено, что опухоль имеет фенотип иммуной эксклюзии, терапия рака (например, CBT) отдельно может являться неэффективной, поскольку опухоль не имеет достаточного количества цитотоксических клеток в окружении опухоли. Дополнительная терапия ингибитором TGFβ1, таким как описанный в настоящем документе, может снизить иммуносупрессию, тем самым делая опухоль, устойчивую к терапии рака, более чувствительной к терапии рака.

[513] Неинвазивные методы визуализации in vivo могут применяться во множестве подходящих способов для целей диагностики пациентов; отбора или идентификации пациентов, которым может помочь терапия ингибитором TGFβ1; и/или мониторинга пациентов на предмет терапевтического ответа на лечение. Любые клетки с известным маркером клеточной поверхности могут быть обнаружены/локализованы посредством использования антитела или подобных молекул, которые специфически связываются с клеточным маркером. Как правило, клетки, которые должны быть обнаружены с помощью таких методов, представляют собой иммунные клетки, такие как цитотоксические Т-лимфоциты, регуляторные Т-клетки, MDSC, ассоциированные с опухолью макрофаги, NK-клетки, дендритные клетки и нейтрофилы. Антитела или сконструированные антителоподобные молекулы, распознающие такие маркеры, могут быть соединены с обнаруживающим фрагментом.

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

[515] Согласно некоторым вариантам осуществления визуализация in vivo предусматривает отслеживание Т-клеток, таких как цитотоксические CD8-положительные Т-клетки. Соответственно, любой из высокоаффинных, селективных в отношении изоформы ингибиторов TGFβ1 согласно настоящему раскрытию может быть использован для лечения рака у субъекта с солидной опухолью, причем лечение предусматривает: i) проведение анализа изображений in vivo для обнаружения Т-клеток у субъекта, где необязательно Т-клетки представляют собой CD8+ Т-клетки, и если солидная опухоль

определена как солидная опухоль с иммунным исключением на основании анализа изображений in vivo на стадии (i), то введение в субъекту терапевтически эффективного количества высокоаффинного селективного в отношении изоформы ингибитора TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект получил СВТ, при этом солидная опухоль необязательно устойчива к СВТ. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят СВТ в сочетании с ингибитором TGFβ1 в качестве комбинированной терапии. Комбинация может включать в себя введение одного состава, который содержит как ингибитор контрольной точки, так и ингибитор TGFβ1. Альтернативно, комбинированная терапия может содержать введение первого состава, содержащего ингибитор контрольной точки, и второго состава, содержащего ингибитор TGFβ1.

[516] Согласно некоторым вариантам осуществления визуализация in vivo предусматривает отслеживание MDSC, таких как G-MDSC (также известные как PMN-MDSC) и M-MDSC. Например, клетками MDSC может быть обогащен очаг заболевания (такой как фиброзные ткани и солидные опухоли) на исходном уровне. После терапии (например, терапии ингибитором TGFβ1) может наблюдаться меньшее количество MDSC, что измеряется по снижению интенсивности метки (такой как радиоизотоп и флуоресценция), что свидетельствует о терапевтических эффектах.

[517] Согласно некоторым вариантам осуществления визуализация in vivo предусматривает отслеживание или локализацию LRRC33-положительных клеток. LRRC33-положительные клетки включают в себя, например, MDSC и активированные M2-подобные макрофаги (например, TAM и активированные макрофаги, ассоциированные с фиброзными тканями). Например, LRRC33-положительными клетками может быть обогащен очаг заболевания (такой как фиброзные ткани и солидные опухоли) на исходном уровне. После терапии (например, терапии ингибитором TGFβ1) может наблюдаться меньшее количество клеток, экспрессирующих LRRC33 клеточной поверхности, что измеряется по уменьшенной интенсивности метки (такой как радиоизотоп и флуоресценция), что свидетельствует о терапевтических эффектах.

[518] Согласно некоторым вариантам осуществления визуализация in vivo предусматривает использование ПЭТ-ОФЭКТ, МРТ и/или оптической флуоресценции/биолюминесценции для обнаружения представляющей интерес мишени (например, молекул или объектов, которые могут быть связаны меченым реагентом, таких как клетки и ткани, экспрессирующие соответствующий(е) маркер(ы)).

[519] Согласно некоторым вариантам осуществления мечение антител или антителоподобных молекул обнаруживающим фрагментом может содержать прямое мечение или непрямое мечение.

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

[521] Таким образом, такие способы могут использоваться для получения изображений in vivo с использованием меченых антител в иммуно-ПЭТ.

[522] Согласно некоторым вариантам осуществления такая визуализация in vivo выполняется для мониторинга терапевтического ответа на терапию ингибированием TGFβ1 у субъекта. Например, терапевтический ответ может включать в себя преобразование опухоли с иммунным исключением в воспаленную опухоль, что коррелирует с повышенной инфильтрацией иммунных клеток в опухоль. Это может быть визуализировано по увеличению частоты встречаемости внутриопухолевых иммунных клеток или степени обнаружения сигналов, таких как радиоактивная метка и флуоресценция.

[523] Соответственно, настоящее изобретение относится к способу лечения рака, который может предусматривать следующие стадии: i) выбор пациента, у которого диагностирован рак, включая в себя солидную опухоль, при этом солидная опухоль является или предположительно является опухолью с иммунным исключением; и, ii) введение пациенту антитела или фрагмента, предусмотренного в настоящем документе, в количестве, эффективном для лечения рака. Согласно некоторым вариантам осуществления пациент получил или является кандидатом на получение терапии рака, такой как терапия ингибированием иммунных контрольных точек (например, антитела к PD-(L)1), виды химиотерапии, лучевой терапии, терапии с использованием модифицированных сконструированных иммунных клеток и терапии противораковой вакциной. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия выбора (i) предусматривает обнаружение иммунных клеток или одного или нескольких их маркеров, где необязательно обнаружение предусматривает анализ биопсии опухоли, анализ маркеров сыворотки и/или визуализацию in vivo.

[524] Согласно некоторым вариантам осуществления у пациента диагностирован рак, для которого была одобрена СВТ, при этом, необязательно, статистически аналогичная популяция пациентов с конкретным раком показывает относительно низкие показатели ответа на одобренную СВТ, например, менее 25%. Например, процент пациентов с объективным ответом для СВТ может составлять приблизительно 10-25%, например приблизительно 10-15%. Такой рак может включать в себя, например, рак яичников, рак

желудка и трижды негативный рак молочной железы. Высокоаффинные, селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему раскрытию могут использоваться для лечения такого рака, когда субъект еще не получил СВТ. Ингибитор TGFβ1 можно вводить субъекту в комбинации с СВТ. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект может получать или мог получать дополнительную терапию рака, такую как химиотерапия и лучевая терапия.

[525] Описанные выше методики визуализации in vivo можно использовать для обнаружения, локализации и/или отслеживания определенных MDSC у пациента, у которого диагностировано заболевание, связанное с TGFβ1, такое как рак и фиброз. У здоровых индивидуумов MDSC отсутствуют в кровотоке или они нечасто встречаются. С началом или прогрессированием такого заболевания могут быть обнаружены повышенные уровни циркулирующих и/или локализованных в заболевании MDSC. Например, сообщалось, что CCR2-положительные M-MDSC накапливаются в тканях с воспалением и могут вызывать прогрессирование фиброза в ткани (такого как фиброз легких), и это, как показано, коррелирует с экспрессией TGFβ1. Аналогично, MDSC обогащен ряд солидных опухолей (включая в себя трижды негативный рак молочной железы), и они частично вносят вклад в иммуносупрессивный фенотип TME. Следовательно, терапевтический ответ на терапию, ингибирующую TGFβ1, согласно настоящему раскрытию, можно подвергать мониторингу путем локализации или отслеживания MDSC. Снижение или низкая частота обнаруживаемых MDSC, как правило, указывает на терапевтический эффект или лучший прогноз.

[526] Таким образом, высокоаффинный, контекстно-независимый ингибитор активации TGFβ1 может быть использован при лечении рака у субъекта, при этом рак характеризуется иммуносупрессией, причем рак необязательно содержит солидную опухоль, которая является TGFβ1-положительной и TGFβ3-положительный. У такого субъекта может быть диагностирована карцинома. Согласно некоторым вариантам осуществления карцинома представляет собой карциному молочной железы, при этом карцинома молочной железы необязательно представляет собой трижды негативный рак молочной железы (TNBC). Такое лечение может дополнительно содержать противоопухолевую терапию, включая в себя без ограничения химиотерапию, лучевую терапию, противораковые вакцины, терапию с использованием сконструированных иммунных клеток (например, CAR-T) и терапию блокадой иммунных контрольных точек, такую как антитела к PD(L)-1.

[527] Согласно некоторым вариантам осуществления идентифицирована холодная опухоль, в которой присутствует несколько эффекторных клеток или известно, что это тип

рака, характеризуемый как слабо иммуногенный. Субъекта/пациента с такой опухолью лечат иммуносенсибилизирующей терапией рака, такой как химиотерапия, лучевая терапия, онколитическая вирусная терапия и противораковая вакцина, для того, чтобы вызвать более сильный Т-клеточный ответ на опухолевые антигены (например, неоантигены). Эта стадия может превратить холодную опухоль в опухоль с «иммунным исключением». Субъект необязательно дополнительно получает СВТ, такую как антитело к PD-(L)1. Субъекта дополнительно лечат ингибитором TGFβ1, таким как антитела, раскрытые в настоящем документе. Это может превратить холодную или опухоль с иммунным исключением в «воспаленную» или «горячую» опухоль, что придает чувствительность к иммунотерапии. Неограничивающие примеры слабо иммуногенных форм рака включают в себя рак молочной железы (такой как TNBC), рак предстательной железы (такой как кастрационно-резистентный рак предстательной железы, (CRPC)) и рак поджелудочной железы (такой как аденокарцинома поджелудочной железы (PDAC)).

[528] Как показано на фиг. 5B, высокоаффинные, селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 согласно настоящему изобретению, такие как Ab6, могут ингибировать индуцированную плазмином активацию TGFβ1. Ветка плазмин-плазминоген участвует в определенном онкогенезе, инвазии и/или метастазировании различных типов рака, в частности карциномы, такой как рак молочной железы. Следовательно, возможно, что высокоаффинные, селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, могут проявлять ингибирующие эффекты посредством этого механизма в опухолях или моделях опухолей, таких как EMT6, с участием эпителия. Действительно, плазмин-зависимое разрушение или ремоделирование эпителия может вносить вклад в патогенез состояний, характеризующихся эпителиальными повреждениями и инвазией/распространением карциномы. Последнее может быть вызвано эпителиально-мезенхимальным переходом («EMT»). Сообщалось, что активация плазминогена и зависимая от плазминогена инвазия были более выраженными в эпителиоподобных клетках и частично были продиктованы экспрессией S100A10 и PAI-1 (Bydoun et al. (2018) Scientific Reports, 8:14091).

[529] Настоящее изобретение относится к способу отбора популяции пациентов или субъекта, который, вероятно, будет отвечать на терапию, содержащую специфический в отношении изоформы, контекстно-независимый ингибитор TGFβ1. Такой способ может предусматривать следующие стадии: получение биологического образца (например, клинического образца), взятого у субъекта, определение (например, измерение или анализ) относительных содержаний TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3 в образце и введение субъекту композиции, содержащей специфический в отношении изоформы, контекстно-

независимый ингибитор TGFβ1, если TGFβ1 является доминирующей изоформой по сравнению с TGFβ2 и TGFβ3; и/или если TGFβ1 значительно избыточной экспрессируется или активируется по сравнению с контролем. Согласно некоторым вариантам осуществления такой способ предусматривает следующие стадии: получение информации об относительных уровнях экспрессии TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3, которые были определены ранее; идентификация субъекта с TGFβ1-положительным, предпочтительно TGFβ1-доминантным заболеванием; и введение субъекту композиции, содержащей специфический в отношении изоформы, контекстно-независимый ингибитор TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления такой субъект страдает заболеванием (таким как рак), которое устойчиво к терапии (такой как терапия рака). Согласно некоторым вариантам осуществления такой субъект проявляет непереносимость терапии и, следовательно, уже прекратил или может прекратить терапию. Добавление ингибитора TGFβ1 к схеме лечения может позволить снизить дозировку первой терапии и по-прежнему достичь клинических положительных результатов в комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ1 может отсрочить или снизить потребность в хирургическом вмешательстве.

[530] Относительные уровни изоформ могут быть определены с помощью анализов на основе РНК и/или анализов на основе белков, которые хорошо известны в настоящей области техники. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия введения может также предусматривать другую терапию, такую как ингибиторы иммунных контрольных точек или другие средства, представленные в другом месте в настоящем документе. Такие способы могут необязательно предусматривать стадию оценки терапевтического ответа путем мониторинга изменений относительных содержаний TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3 в двух или более временных точках. Согласно некоторым вариантам осуществления клинические образцы (например, образцы биопсии) собирают как до, так и после введения. Согласно некоторым вариантам осуществления клинические образцы (например, образцы биопсии) собирают несколько раз после лечения для оценки эффектов in vivo с течением времени.

[531] В дополнение к вышеупомянутым исследованиям, третье исследование изучает широту функции TGFβ1, вовлеченной в конкретное заболевание. Это может быть представлено количеством *контекстов* TGFβ1, а именно, какая(ие) презентирующая(ие) молекула(ы) опосредует(ют) ассоциированную с заболеванием функцию TGFβ1. TGFβ1-специфические ингибиторы широкого контекста, такие как контекстно-независимые ингибиторы, благоприятны для лечения заболеваний, которые характеризуются как компонентом ECM, так и иммунным компонентом функции TGFβ1. Такое заболевание может быть ассоциировано с дисрегуляцией ECM, а также с нарушением функции

иммунных клеток или иммунного ответа. Таким образом, описанные в настоящем документе ингибиторы TGFβ1 способны нацеливаться на ECM-ассоциированный TGFβ1 (например, презентированный LTBP1 или LTBP3), а также ассоциированный с иммунными клетками TGFβ1 (например, презентированный GARP или LRRC33). Такие ингибиторы ингибируют все четыре терапевтические мишени (например, «контекстно-независимые» ингибиторы): GARP-ассоциированный про/латентный TGFβ1; LRRC33-ассоциированный про/латентный TGFβ1; LTBP1-ассоциированный про/латентный TGFβ1; и LTBP3-ассоциированный про/латентный TGFβ1, чтобы в значительной степени ингибировать функцию TGFβ1 в этих контекстах.

[532] Связано ли конкретное состояние пациента с несколькими аспектами функции TGFβ1 или обусловлено ими, можно оценить, оценив профили экспрессии презентирующих молекул в клиническом образце, взятом у пациента. В настоящей области техники известны различные анализы, включая в себя анализы на основе РНК и анализы на основе белков, которые могут быть выполнены для получения профилей экспрессии. Относительные уровни экспрессии (и/или их изменения) LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33 в образце(ах) могут указывать на источник и/или контекст активностей TGFβ1, ассоциированных с состоянием. Например, образец биопсии, взятый из солидной опухоли, может демонстрировать высокую экспрессию всех четырех презентирующих молекул. Например, LTBP1 и LTBP3 могут в высокой степени экспрессироваться в CAF в строме опухоли, тогда как GARP и LRRC33 могут в высокой степени экспрессироваться ассоциированными с опухолью иммунными клетками, такими как Treg и инфильтрат лейкоцитов соответственно.

[533] Соответственно, настоящее изобретение относится к способу определения (например, тестирования или подтверждения) участия TGFβ1 в заболевании по сравнению с TGFβ2 и TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает стадию: идентификации источника (или контекста) ассоциированного с заболеванием TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления источник/контекст оценивается путем определения экспрессии молекул, презентирующих TGFβ, например, LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33, в клиническом образце, взятом у пациентов. Согласно некоторым вариантам осуществления такие способы выполняют *ex post facto*.

[534] Что касается LRRC33-положительных клеток, заявитель настоящего раскрытия признал, что может быть значительное расхождение между экспрессией РНК и экспрессией белка LRRC33. В частности, хотя некоторые типы клеток, по-видимому, экспрессируют LRRC33 на уровне РНК, только часть таких клеток экспрессирует белок LRRC33 на клеточной поверхности. Предполагается, что экспрессия LRRC33 может сильно

регулироваться посредством переноса/локализации белка, например, с точки зрения встраивания в плазматическую мембрану и быстрой интернализации. Следовательно, согласно предпочтительным вариантам осуществления экспрессия белка LRRC33 может использоваться в качестве маркера, ассоциированного с пораженной заболеванием тканью (такой как опухоль и фиброзные ткани), обогащенной, например, активированными/M2-подобными макрофагами и MDSC.

Показания, связанные с TGFβ1

Общие особенности показаний, связанных с TGFβ1

[535] Селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения широкого спектра заболеваний, нарушений и/или состояний, которые ассоциированы с нарушением регуляции TGFβ1 (т.е., *«показаний, связанных с TGFβ1»*) у людей-субъектов. Как используется в настоящем документе, «заболевание (нарушение или состояние), связанное с нарушением регуляции TGFβ1» или «показание, связанное с TGFβ1» означает любое заболевание, нарушение и/или состояние, связанное с экспрессией, активностью и/или метаболизмом TGFβ1, или любое заболевание, нарушение и/или состояние, которое может иметь эффект от ингибирования активности и/или уровней TGFβ1.

[536] Соответственно, настоящее изобретение предусматривает применение специфического в отношении изоформы контекстно-независимого ингибитора TGFβ1 в способе лечения показаний, связанных с TGFβ1, у субъекта-человека. Такой ингибитор, как правило, вводят в фармацевтическую композицию, которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемый наполнитель. Предпочтительно ингибитор нацелен как на ECM-ассоциированный TGFβ1, так и на ассоциированный с иммунными клетками TGFβ1, но не нацелен на TGFβ2 или TGFβ3 in vivo. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор ингибирует стадию активации TGFβ1. Заболевание может характеризоваться нарушением регуляции или нарушением по меньшей мере двух из следующих признаков: a) регуляторные Т-клетки (Treg); b) пролиферация или функция эффекторных Т-клеток (Teff); c) пролиферация или дифференцировка миелоидных клеток; d) рекрутинг или дифференцировка моноцитов; e) функция макрофагов; f) эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) и/или эндотелиально-мезенхимальный переход (EndMT); g) экспрессия гена в одном или нескольких маркерных генах, выбранных из группы, состоящей из: PAI-1, ACTA2, CCL2, Col1a1, Col3a1, FN-1, CTGF и TGFB1; h) компоненты или функция ECM; i) дифференцировка фибробластов. Терапевтически эффективное количество такого

ингибитора вводят субъекту, страдающему заболеванием или которому поставлен его диагноз.

[537] Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание включает нарушение регуляции или нарушение компонентов или функций ECM, которые демонстрируют повышенное отложение коллагена I типа. Согласно некоторым вариантам осуществления нарушение регуляции ECM включает повышенную жесткость матрикса. Согласно некоторым вариантам осуществления нарушение регуляции ECM включает фибронектин и/или фибриллин.

[538] Согласно некоторым вариантам осуществления нарушение регуляции или нарушение дифференцировки фибробластов включает увеличение количества миофибробластов или миофибробластоподобных клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления миофибробласты или миофибробластоподобные клетки представляют собой фибробласты, ассоциированные с раком (CAF). Согласно некоторым вариантам осуществления CAF ассоциированы со стромой опухоли и могут продуцировать CCL2/MCP-1 и/или CXCL12/SDF-1. Согласно некоторым вариантам осуществления миофибробласты или миофибробластоподобные клетки локализуются в фиброзной ткани.

[539] Согласно некоторым вариантам осуществления нарушение регуляции или нарушение регуляторных Т-клеток включает повышенную активность Treg.

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

[541] Согласно некоторым вариантам осуществления нарушение регуляции или нарушение пролиферации или дифференцировки миелоидных клеток включает повышенную пролиферацию миелоидных клеток-предшественников. Повышенная пролиферация миелоидных клеток может происходить в костном мозге.

[542] Согласно некоторым вариантам осуществления нарушение регуляции или нарушение дифференцировки моноцитов включает повышенную дифференцировку моноцитов, происходящих из костного мозга, и/или резидентных моноцитов ткани в макрофаги в очаге заболевания, таком как фиброзная ткань и/или солидная опухоль.

[543] Согласно некоторым вариантам осуществления нарушение регуляции или нарушение рекрутинга моноцитов включает повышение рекрутинга моноцитов, происходящих из костного мозга, в очаг заболевания, такой как TME, что приводит к повышению дифференцировки макрофагов и поляризации M2 с последующим увеличением TAM.

[544] Согласно некоторым вариантам осуществления нарушение регуляции или нарушение функции макрофагов включает повышенную поляризацию макрофагов в фенотипы M2.

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

[546] Показания, связанные с TGFβ, могут включать состояния, включающие микроокружение иммуноисключающего заболевания, такое как опухоль или злокачественная ткань, которая подавляет нормальный защитный механизм/иммунитет организма частично за счет исключения эффекторных иммунных клеток (например, CD4+ и/или CD8+ Т-клеток). Согласно некоторым вариантам осуществления такие иммуноисключающие состояния ассоциированы с неэффективной реакцией на лечение (например, терапию рака). Неограничивающие примеры видов терапии рака, на которые пациенты неэффективно реагируют, включают без ограничения: терапию ингибиторами контрольных точек, противораковые вакцины, химиотерапию и лучевую терапию. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, предполагается, что ингибиторы TGFβ, такие как описанные в настоящем документе, могут способствовать противодействовать способности опухоли ускользать от противоракового иммунологического надзора или исключать его путем восстановления доступа иммунных клеток, например, Т-клеток (например, CD8+ клеток) и макрофагов (например, F4/80+ клеток, M1-поляризованных макрофагов), способствуя экспансии и/или инфильтрации Т-клеток в опухоль.

[547] Таким образом, ингибирование TGFβ может преодолевать устойчивость к лечению (например, устойчивость к иммунным контрольным точкам, устойчивость к противораковым вакцинам, устойчивость к CAR-T, устойчивость к химиотерапии, устойчивость к лучевой терапии и т.д.) в среде иммуноисключающего заболевания (например, TME) путем разблокирования и восстановления доступа эффекторных Т-клеток и цитотоксических эффекторных функций. Такие эффекты ингибирования TGFβ могут дополнительно обеспечивать длительную иммунологическую память, опосредованную, например, CD8+ Т-клетками.

[548] Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль является слабоиммуногенной (например, «пустынные» или «холодные» опухоли). Пациентам может быть полезна терапия рака, которая запускает неоантигены или способствует иммунным ответам. Такие виды лечения включают без ограничения химиотерапию, лучевую терапию, онколитическую вирусную терапию, онколитические пептиды, ингибиторы тирозинкиназы, неоэпитопные вакцины, антитела к CTLA4, индукторы нестабильности,

агенты DDR, активаторы NK-клеток и различные вспомогательные средства, такие как лиганды/агонисты TLR. Ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, можно использовать вместе для усиления эффектов видов лечения рака. Одним из механизмов действия ингибиторов TGFβ1 может быть нормализация или восстановление экспрессии MHC, тем самым происходит стимуляция Т-клеточного иммунитета.

[549] Неограничивающие примеры показаний, связанных с TGFβ, включают в себя: фиброз, в том числе фиброз органов (например, фиброз почек, фиброз печени, фиброз сердца/сердечно-сосудистой системы, фиброз мышц, фиброз кожи, фиброз/эндометриоз матки и фиброз легких), склеродермию, синдром Альпорта, рак (в том числе без ограничения: рак крови, такой как лейкоз, миелофиброз, множественная миелома, рак толстой кишки, рак почек, рак молочной железы, злокачественная меланома, глиобластома), фиброз, ассоциированный с солидными опухолями (например, злокачественная десмоплазия, такая как десмопластическая меланома, десмоплазия, ассоциированная с раком поджелудочной железы и десмоплазия карциномы молочной железы), стромальный фиброз (например, стромальный фиброз молочной железы), индуцированный излучением фиброз (например, синдром радиационного фиброза), ускорение кроветворения после химиотерапии, заживление костей, заживление ран, деменцию, миелофиброз, миелодисплазию (например, миелодиспластический синдром или MDS), заболевание почек (например, терминальная стадия почечной недостаточности или ESRD), одностороннюю обструкцию мочеточников (UUO), потерю и/или дегенерацию зубов, синдромы эндотелиальной пролиферации, астму и аллергию, желудочно-кишечные нарушения, анемию старения, аневризму аорты, орфанные признаки (такие как синдром Марфана и болезнь Камурати-Энгельмана), ожирение, сахарный диабет, артрит, рассеянный склероз, мышечную дистрофию, нарушения костей, амиотрофический латеральный склероз (ALS), болезнь Паркинсона, остеопороз, остеоартрит, остеопению, метаболические синдромы, нарушения питания, атрофия органов, хроническую обструктивную болезнь легких (COPD) и анорексию.

[550] Данные свидетельствуют о том, что эктонуклеотидазы CD39 и CD73 могут по меньшей мере частично способствовать повышению уровней аденозина при патологических состояниях. Примечательно, что ось CD39/CD73-TGFβ может играть роль в модуляции иммунных клеток, участвующих в передаче сигналов с участием TGFβ, в том числе Treg и MDSC. Как регуляторные Т-клетки (Treg), так и миелоидные супрессорные клетки (MDSC), как правило, обладают иммуносупрессорными фенотипами. При многих патологических состояниях (например, раке, фиброзе) эти клетки обогащаются в очагах заболевания и могут способствовать созданию и/или поддержанию иммуносупрессорного

окружения. Это может быть по меньшей мере частично опосредовано эктонуклеотидазами CD39 и CD73, которые вместе участвуют в расщеплении АТФ на нуклеозид аденозин, что приводит к повышенным локальным концентрациям аденозина в патологическом окружении, таком как микроокружение опухоли и фиброзное окружение. Аденозин может связываться со своими рецепторами, экспрессируемыми на клетках-мишенях, таких как Т-клетки и NK-клетки, которые, в свою очередь, подавляют противоопухолевую функцию этих клеток-мишеней.

Заболевания с аберрантной экспрессией генов; биомаркеры

[551] Было замечено, что аномальная активация пути передачи сигналов с участием TGFβ1 при различных патологических состояниях ассоциирована с измененной экспрессией генов ряда маркеров. Эти маркеры экспрессии генов (например, при измерении с помощью мРНК) включают без ограничения: серпин 1 (кодирует PAI-1), MCP-1 (также известный как CCL2), Col1a1, Col3a1, FN1, TGFB1, CTGF, ACTA2 (кодирует α-SMA), SNAI1 (управляет EMT при фиброзе и метастазировании за счет подавления Е-кадгерина (Cdh1), MMP2 (матриксная металлопротеиназа, ассоциированная с EMT), MMP9 (матриксная металлопротеиназа, ассоциированная с EMT), TIMP1 (матриксная металлопротеиназа, ассоциированная с EMT), FOXP3 (маркер индукции Treg), CDH1 (E-кадгерин (маркер эпителиальных клеток), который подавляется TGFβ) и CDH2 (N-кадгерин (маркер мезенхимальных клеток), который активируется TGFβ). Интересно, что многие из этих генов вовлечены в различные патологические состояния, в том числе различные типы фиброза органов, а также многие виды рака, в том числе миелофиброз. Действительно, предполагалась патофизиологическая связь между фиброзными состояниями и аномальной пролиферацией клеток, онкогенезом и метастазированием. См., например, Cox and Erler (2014) Clinical Cancer Research 20(14): 3637-43 “Molecular pathways: connecting fibrosis and solid tumor metastasis”; Shiga et al. (2015) Cancers 7:2443-2458 “Cancer-associated fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth”; Wynn and Barron (2010) Semin. Liver Dis. 30(3): 245-257 “Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis”, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, авторы настоящего раскрытия предполагают, что сигнальный путь с участием TGFβ1 на самом деле может быть ключевым звеном между этими разнообразными патологиями.

[552] Способность хемотаксических цитокинов (или хемокинов) опосредовать рекрутинг лейкоцитов (например, моноцитов/макрофагов) в поврежденные или патологические ткани имеет решающее значение в прогрессировании заболевания.

Представители семейства хемокинов C-C, такие как хемоаттрактантный белок моноцитов 1 (MCP-1), также известный как CCL2, воспалительный белок макрофагов 1-альфа (MIP-1α), также известный как CCL3, и MIP-1β, также известный как CCL4, и MIP-2α, также известный как CXCL2, участвуют в этом процессе.

[553] Например, считается, что MCP-1/CCL2 играет роль как в фиброзе, так и в раке. MCP-1/CCL2 характеризуется как профибротический хемокин и является хемоаттрактантом моноцитов, и данные свидетельствуют о том, что он может участвовать как в инициации, так и в прогрессировании рака. Было показано, что при фиброзе MCP-1/CCL2 играет важную роль в воспалительной фазе фиброза. Например, нейтрализация MCP-1 приводили к значительному снижению образования структур в виде полумесяца в клубочках и отложению коллагена I типа. Аналогичным образом продемонстрировано, что пассивная иммунотерапия антителами к MCP-1 или антителами к MIP-1 альфа значительно снижает накопление мононуклеарных фагоцитов у мышей, подверженных воздействию блеомицина, что позволяет предположить, что MIP-1 альфа и MCP-1 способствуют рекрутингу лейкоцитов во время воспалительного ответа в легких (Smith, Biol Signals. 1996 Jul-Aug;5(4):223-31, “Chemotactic cytokines mediate leukocyte recruitment in fibrotic lung disease”). Сообщалось о повышенных уровнях MIP-1 альфа у пациентов с муковисцидозом и множественной миеломой (см., например: Mrugacz et al., J Interferon Cytokine Res. 2007 Jun; 27(6):491-5), что поддерживает идею о том, что MIP-1α ассоциирован с локализованными или системными воспалительными ответами.

[554] Ряд доказательств указывает на участие хемокинов C-C в прогрессировании/метастазировании опухоли. Например, MCP-1/CCL2, полученный из опухоли, может стимулировать «предраковые» фенотипы в макрофагах. Например, при раке легких было продемонстрировано, что MCP-1/CCL2 продуцируется стромальными клетками и способствует метастазированию. При раке поджелудочной железы человека опухоли секретируют CCL2, и иммуносупрессорые CCR2-положительные макрофаги инфильтрируют эти опухоли. Пациенты с опухолями, которые демонстрируют высокую экспрессию CCL2/низкий инфильтрат Т-лимфоцитов CD8, характеризовались значительно сниженной выживаемостью. Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, предполагается, что моноциты, которые рекрутируются в окружение поврежденной или патологической ткани, могут впоследствии становиться поляризованными в ответ на местные сигналы (например, в ответ на цитокины, происходящие из опухоли), тем самым еще больше способствуя прогрессированию заболевания. Эти M2-подобные макрофаги, вероятно, способствуют ускользанию от иммунологического надзора, подавляя эффекторные клетки, такие как CD4+ и CD8+ Т-клетки. Согласно некоторым вариантам

осуществления этот процесс частично опосредуется LRRC33-TGFβ1, экспрессируемым активированными макрофагами. Согласно некоторым вариантам осуществления этот процесс частично опосредуется GARP-TGFβ1, экспрессируемым Treg.

[555] Аналогичным образом, при определенных карциномах, таких как рак молочной железы (например, тройной негативный рак молочной железы), было продемонстрировано, что опосредованный CXCL2/CCL22 рекрутинг MDSC способствует ангиогенезу и метастазированию (см., например, Kumar et al. (2018) J Clin Invest 128(11): 5095-5109). Следовательно, предполагается, что этот процесс по меньшей мере частично опосредуется TGFβ1, таким как LRRC33-TGFβ1. Более того, поскольку протеазы, такие как MMP9, участвуют в процессе ремоделирования матрикса, который способствует инвазии и метастазированию опухоли, одни и те же или перекрывающиеся сигнальные пути также могут играть роль в фиброзе.

[556] Участие PAI-1/серпин 1 было продемонстрировано при различных фиброзных состояниях, различных видах рака, ангиогенезе, воспалении, а также нейродегенеративных заболеваниях (например, болезни Альцгеймера). Повышенная экспрессия PAI-1 в опухоли и/или сыворотке крови коррелирует с неблагоприятным прогнозом (например, более короткой выживаемостью, повышенным метастазированием) при различных видах рака, таких как рак молочной железы и рак мочевого пузыря (например, переходно-клеточная карцинома), а также миелофиброзе. В контексте фиброзных состояний PAI-1 был признан важным нисходящим эффектором фиброза, индуцированного TGFβ1, и повышенная экспрессия PAI-1 наблюдалась при различных формах фиброза тканей, в том числе фиброза легких (например, IPF), фиброза почек, фиброза печени и склеродермии. Согласно некоторым вариантам осуществления процесс частично опосредуется ECM-ассоциированным TGFβ1, например, посредством LTBP1-proTGFβ1 и/или LTBP3-proTGFβ1.

[557] Согласно некоторым вариантам осуществления in vivo эффекты терапии ингибитором TGFβ1 можно оценить путем измерения изменений уровней экспрессии подходящих маркеров генов. Подходящие маркеры включают TGFβ (например, TGFB1, TGFB2 и TGFB3). Подходящие маркеры могут также включать одну или несколько презентирующих молекул для TGFβ (например, TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3), таких как LTBP1, LTBP3, GARP (или LRRC32) и LRRC33. Согласно некоторым вариантам осуществления подходящие маркеры включают гены мезенхимального перехода (например, AXL, ROR2, WNT5A, LOXL2, TWIST2, TAGLN и/или FAP), иммуносупрессорные гены (например, IL10, VEGFA, VEGFC), хемотаксические гены моноцитов и макрофагов (например, CCL2, CCL3, CCL4, CCL7, CCL8, CCL13 и CCL22) и/или различные фиброзные маркеры,

обсуждаемые в настоящем документе. Предпочтительными маркерами являются маркеры плазмы/сыворотки крови.

[558] Как показано в Примере в настоящем документе, специфические в отношении изоформы контекстно-независимые ингибиторы TGFβ1, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для снижения уровней экспрессии многих из этих маркеров в подходящих доклинических моделях, в том числе механистических животных моделях, таких как UUO, которая, как было продемонстрировано, является TGFβ1-зависимой. Следовательно, такие ингибиторы могут быть использованы для лечения заболевания или нарушения, характеризующихся аномальной экспрессией (например, сверхэкспрессией/повышенной регуляцией или недостаточной экспрессией/сниженной регуляцией) одного или нескольких маркеров экспрессии генов заболевания.

[559] Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления специфический в отношении изоформы контекстно-независимый ингибитор TGFβ1 используют для лечения заболевания, связанного со сверхэкспрессией одного или нескольких из следующего: PAI-1 (кодируемый серпин 1), MCP-1 (также известный как CCL2), Col1a1, Col3a1, FN1, TGFB1, CTGF, α-SMA, ITGA11 и ACTA2, при этом лечение включает введение ингибитора субъекту, страдающему от заболевания в количестве, эффективном для лечения заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор используют для лечения заболевания, ассоциированного со сверхэкспрессией PAI-1, MCP-1/CCL2, CTGF и/или α-SMA. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание представляет собой миелофиброз. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание представляет собой рак, например рак, включающий солидную опухоль. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание представляет собой фиброз органов, например, фиброз печени (например, ассоциированный с NASH), почек, легких, мышц, кожи и/или сердца или сердечно-сосудистой ткани.

[560] Включение пути TGFβ1 в контроль ключевых аспектов как ECM, так и иммунных компонентов может служить объяснением тех наблюдений, что значительное количество генов с нарушенной регуляцией являются общими для широкого спектра патологий, таких как пролиферативные нарушения и фиброзные нарушения. Это подтверждает мнение о том, что аберрантный профиль экспрессии в генах, участвующих в передаче сигналов с участием TGFβ1, вероятно, является обобщаемым явлением. Эти гены маркеров можно разделить на несколько категорий, таких как: гены, участвующие в мезенхимальном переходе (например, EndMT и EMT); гены, участвующие в ангиогенезе; гены, участвующие в гипоксии; гены, участвующие в заживлении ран; и гены, участвующие в воспалительной реакции, вызванной повреждением ткани.

[561] Всестороннее исследование, проведенное Hugo et al. (Cell, 165(1): 35-44), наглядно продемонстрировало корреляцию между паттернами дифференциальной экспрессии генов этих классов маркеров и реакцией на терапию блокадой контрольных точек (CBT) при метастатической меланоме. Авторы обнаружили, что совместное обогащение набора генов, называемых «сигнатурами IPRES», определяло транскриптомную подгруппу не только в меланоме, но и во всех проанализированных основных распространенных злокачественных новообразованиях человека. Действительно, исследование связывает фенотипическую пластичность опухолевых клеток (т.е., мезенхимальный переход) и полученные в результате воздействия на микроокружение (например, ремоделирование ECM, клеточную адгезию и особенности ангиогенеза при иммуносупрессорном заживлении ран) с устойчивостью к CBT.

[562] Признавая, что каждая из этих категорий генов IPRES участвовала в заболевании, включающем нарушение регуляции TGFβ, заявитель ранее предполагал, что изоформа TGFβ1, в частности, может опосредовать эти процессы при патологических состояниях (см., например, WO 2017/156500). Исследование, раскрываемое в настоящем документе, дополнительно подтверждает это представление (например, Пример 11; фиг. 37A), дополнительно подтверждая, что виды лечения, избирательно нацеленные на TGFβ1 (в отличие от неселективных альтернатив), могут иметь преимущество как в отношении эффективности, так и безопасности.

[563] Соответственно, настоящее раскрытие предусматривает способ/процесс выбора или идентификации пациента-кандидата или популяции пациентов, которые, вероятно, будут реагировать на терапию ингибированием TGFβ1, и введение пациенту (пациентам) эффективного количества высокоаффинного селективного в отношении изоформы ингибитора TGFβ1. Наблюдение за отсутствием у пациента реакции на CBT (например, устойчивость) может указывать на то, что пациент является кандидатом на терапию ингибирования TGFβ1, описанную в настоящем документе. Таким образом, высокоаффинный селективный в отношению изоформ ингибитор TGFβ1, такой как раскрываемый в настоящем документе, можно использовать для лечения рака у субъекта, при котором субъект является слабо восприимчивым к CBT. У субъекта может быть распространенный рак, такой как местнораспространенная солидная опухоль или метастатический рак. Пациент считается «слабо реагирующим», когда значимые терапевтические эффекты отсутствуют или достигнуты незначительно (например, не соответствуют критериям частичного ответа или конкурентного ответа, основанным на стандартных рекомендациях, таких как RECIST и iRECIST) по прошествии определенного времени, которое, как ожидается, будет достаточным для демонстрации значимого

терапевтического эффекта конкретной терапии. Обычно такая продолжительность СВТ составляет по меньшей мере приблизительно 3 месяца лечения с дополнительными видами терапии, такими как химиотерапия, или без них. Таких пациентов можно называть «неответившими на терапию». Если такие пациенты плохо отвечают на начальную СВТ, пациентов можно называть «неответившими на первичную терапию». Рак (или пациентов с таким видом рака) в этой категории можно охарактеризовать как характеризующийся «первичной устойчивостью» к СВТ. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект является неответившим на первичную терапию после получения по меньшей мере в течение приблизительно 3 месяцев лечения СВТ, при этом необязательно после по меньшей мере в течение приблизительно 4 месяцев лечения СВТ. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект также получал дополнительную терапию в комбинации с СВТ, такую как химиотерапию.

[564] После идентификации субъекта как неответившего на терапию СВТ, высокоаффинный селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1 может быть введен субъекту в сочетании с СВТ, которая может включать или не включать тот же ингибитор контрольной точки, что и первая СВТ, на которую субъект ответил неэффективно. Можно использовать любые подходящие ингибиторы иммунных контрольных точек, например, одобренные ингибиторы контрольных точек. Согласно некоторым вариантам осуществления высокоаффинный селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1 вводят субъекту в сочетании с СВТ, включающей антитело к PD-1 или антитело к PD-L1. Высокоаффинный селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1 направлен на преодоление устойчивости, делая рак более восприимчивым к СВТ.

[565] Процесс выбора или идентификации пациента-кандидата или популяции пациентов, которые, вероятно, будут реагировать на терапию ингибированием TGFβ1, может включать стадию исследования биологического образца, взятого у пациента (или популяции пациентов), такого как биоптаты, в отношении экспрессии одного или нескольких маркеров, обсуждаемых в настоящем документе. Аналогичным образом, такой (такие) генетический (генетические) маркер (маркеры) можно использовать для целей мониторинга восприимчивости пациента на терапию. Мониторинг может включать исследование двух или более биологических образцов, собранных у пациента, например, до и после назначения терапии, а также во время терапевтического режима в динамике, для оценки изменений в уровнях экспрессии генов одного или нескольких маркеров, что свидетельствует о терапевтическом ответе или эффективности. Согласно некоторым вариантам осуществления можно использовать жидкую биопсию.

[566] Согласно некоторым вариантам осуществления способ выбора пациента-кандидата или популяции пациентов, которые, вероятно, будут реагировать на терапию ингибированием TGFβ1, может включать стадию идентификации пациента или популяции пациентов, ранее исследованных в отношении генетического (генетических) маркера (маркеров), такого (таких), как описан (описаны) в настоящем документе, которые продемонстрировали свою аберрантную экспрессию. Эти же способы также применимы для более позднего подтверждения или корреляции с ответом пациентов на терапию.

[567] Согласно некоторым вариантам осуществления аберрантная экспрессия маркера включает повышенные уровни по меньшей мере одного из следующих: TGFβ1, LRRC33, GARP, LTBP1, LTBP3, CCL2, CCL3, PAI-1/Serpine1. Согласно некоторым вариантам осуществления пациент или популяция пациентов (например, биологические образцы, собранные от них) демонстрируют повышенную активацию TGFβ1, фосфо-Smad2/3 или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления пациент или популяция пациентов (например, биологические образцы, собранные от них) демонстрируют повышенные уровни MDSC. Согласно некоторым вариантам осуществления такой пациент или популяция пациентов имеют рак, который может включать солидную опухоль, которая является TGFβ1-положительной. Солидная опухоль может представлять собой TGFβ1-доминантную опухоль, в которой TGFβ1 является преобладающей изоформой, экспрессируемой в опухоли, по сравнению с другими изоформами. Согласно некоторым вариантам осуществления солидная опухоль может представлять собой TGFβ1-кодоминантную опухоль, в которой TGFβ1 представляет собой кодоминантную изоформу, экспрессируемую в опухоли, например, TGFβ1+/TGFβ3+. Согласно некоторым вариантам осуществления такой пациент или популяция пациентов проявляет устойчивость к терапии рака, такой как химиотерапия, лучевая терапия и/или терапия иммунных контрольных точек, например, антитело к PD-1 (например, пембролизумаб и ниволумаб), антитело к PD-L1 (например, атезолизумаб), антитело к CTLA4 (например, ипилимумаб), терапия сконструированными иммунными клетками (например, CAR-T) и противораковые вакцины и т.д. Согласно настоящему изобретению высокоаффинный контекстно-независимый ингибитор TGFβ1, такой как те, что раскрыты в настоящем документе, преодолевает устойчивость путем разблокирования иммуносупрессии для того, чтобы обеспечить эффекторным клеткам доступ к раковым клеткам, тем самым достигая противоопухолевых эффектов. Следовательно, терапия ингибиторами TGFβ1 может способствовать инфильтрации и/или экспансии эффекторных клеток в опухоли. Кроме того, терапия ингибиторами TGFβ1 может снижать частоту появления иммуносупрессорных иммунных клеток, таких как Treg и MDSC, в опухоли.

[568] Согласно некоторым вариантам осуществления аберрантная экспрессия маркеров включает одну или несколько панелей генов: маркеры мезенхимального перехода (например, AXL, ROR2, WNT5A, LOXL2, TWIST2, TAGLN, FAP); иммуносупрессорные гены (например, IL10, VEGFA, VEGFC); хемотаксические гены моноцитов и макрофагов (например, CCL2, CCL7, CCL8, CCL13); гены, участвующие в ангиогенезе и заживлении ран (например, супрессорные в отношении Т-клеток); маркеры клеточной адгезии; ремоделирование ECM; маркеры костной системы и развития костей; и гены, участвующие в воспалительной реакции, вызванной повреждением ткани.

[569] Согласно некоторым вариантам осуществления отсутствие или подавление экспрессии MHC (например, MHC 1 класса) может служить биомаркером состояний, связанных с TGFβ1, при которых антитела или антигенсвязывающие фрагменты, охватываемые настоящим раскрытием, можно использовать в качестве терапии. Снижение уровня MHC может сигнализировать об ускользании от иммунной системы, что может коррелировать со слабой восприимчивостью пациентов на различные виды иммунотерапии, такие как CBT. Таким образом, избирательное ингибирование TGFβ1 может по меньшей мере частично восстанавливать функцию эффекторных клеток.

Заболевания, связанные с мезенхимальным переходом

[570] Мезенхимальный переход представляет собой процесс фенотипического сдвига клеток, таких как эпителиальные и эндотелиальные клетки, в сторону мезенхимального фенотипа (например, миофибробластов). Примеры генетических маркеров, указывающих на мезенхимальный переход, включают AXL, ROR2, WNT5, LOXL2, TWIST2, TAGLN и FAP. При раке, например, мезенхимальный переход (например, усиление сигнатур EndMT и EMT) указывает на фенотипическую пластичность опухолевых клеток. Таким образом, высокоаффинные специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения заболевания, которое инициировано или обусловлено мезенхимальным переходом, например, EMT и EndMT.

[571] EMT (эпителиально-мезенхимальный переход) представляет собой процесс, при котором эпителиальные клетки с плотными контактами переключаются на мезенхимальные свойства (фенотипы), такие как свободные межклеточные контакты. Этот процесс наблюдается при ряде нормальных биологических процессов, а также в патологических ситуациях, включая эмбриогенез, заживление ран, метастазирование рака и фиброз (см., например, Shiga et al. (2015) “Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth.” Cancers, 7: 2443-2458). Как правило,

считается, что сигналы EMT индуцируются главным образом TGFβ. Например, многие типы рака, по-видимому, связаны с трансдифференцировкой клеток в направлении мезенхимального фенотипа (например, миофибробластов и CAF), что коррелирует с более неблагоприятным прогнозом. Таким образом, специфические в отношении изоформы контекстно-независимые ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения заболевания, которое инициировано или обусловлено EMT. Действительно, данные, приведенные в настоящем документе, в качестве примеров (например, фиг. 7-9), демонстрируют, что такие ингибиторы обладают способностью подавлять экспрессию маркеров миофибробластов/CAF in vivo, таких как α-SMA, LOXL2, Col1 (коллаген I типа) и FN (фибронектин). Таким образом, высокоаффинные, специфические для изоформ ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения заболевания, характеризующегося EMT. Терапевтически эффективное количество ингибитора может представлять собой количество, достаточное для снижения экспрессии маркеров, таких как α-SMA/ACTA2, LOXL2Col1 (коллаген I типа) и FN (фибронектин). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание представляет собой фиброзное нарушение. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание представляет собой пролиферативное нарушение, такое как рак.

[572] Аналогичным образом TGFβ также является ключевым регулятором эндотелиально-мезенхимального перехода (EndMT), наблюдаемого при нормальном развитии, таком как формирование сердца. Однако то же самое или подобное явление также наблюдается во многих тканях, ассоциированных с заболеванием, таких как опухолевая строма и фиброзные очаги. При некоторых патологических процессах эндотелиальные маркеры, такие как CD31, подавляются при воздействии TGFβ1, и вместо этого индуцируется экспрессия мезенхимальных маркеров, таких как FSP-1, α-SMA/ACTA2 и фибронектин. Действительно, стромальные CAF могут происходить из эндотелиальных клеток сосудов. Таким образом, высокоаффинные, специфические для изоформ ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения заболевания, характеризующегося EndMT. Терапевтически эффективное количество ингибитора может представлять собой количество, достаточное для снижения экспрессии маркеров, таких как FSP-1, α-SMA/ACTA2 и фибронектин. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание представляет собой фиброзное нарушение. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание представляет собой пролиферативное нарушение, такое как рак.

Заболевания, связанные с увеличением жесткости и ремоделированием матрикса

[573] Прогрессирование различных показаний, связанных с TGFβ1, таких как фиброзные состояния и рак, включает повышение уровней компонентов матрикса, отложенных в ECM, и/или поддержание/ремоделирование ECM. Сообщалось, что повышенное отложение компонентов ECM, таких как коллагены, может изменять механофизические свойства ECM (например, жесткость матрикса/субстрата), и это явление ассоциировано с передачей сигналов с участием TGFβ1. Заявитель ранее продемонстрировал роль жесткости матрикса в отношении зависимой от интегрина активации TGFβ, используя первичные фибробласты, трансфицированные proTGFβ1 и LTBP1 и выращенные на субстратах на основе кремния с определенной жесткостью (например, 5 кПа, 15 кПа или 100 кПа). Как раскрыто в WO 2018/129329, матриксы с большей жесткостью усиливают активацию TGFβ1, и это можно подавить с помощью специфических в отношении изоформы ингибиторов TGFβ1. Эти наблюдения предполагают, что TGFβ1 влияет на свойства ECM (такие как жесткость), что, в свою очередь, может дополнительно индуцировать активацию TGFβ1, отражающую прогрессирование заболевания.

[574] Таким образом, высокоаффинные специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, могут быть использованы для блокирования этого процесса для противодействия прогрессированию заболевания, включающему изменения ECM, такие как фиброз, рост опухоли, инвазия, метастазирование и десмоплазия. Фрагмент LTBP таких ингибиторов может непосредственно блокировать ECM-ассоциированные про/латентные комплексы TGFβ1, которые представлены LTBP1 и/или LTBP3, тем самым предупреждая активацию/высвобождение фактора роста из комплекса в очаге заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления высокоаффинные специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 могут нормализовать жесткость ECM для лечения заболевания, которое включает интегрин-зависимую передачу сигналов. Согласно некоторым вариантам осуществления интегрин содержит цепь α11, цепь β1 или и то и другое. Архитектура ECM, например, компоненты и организация ECM, также может быть изменена протеазами, ассоциированными с матриксом.

[575] Как рассматривается в работе Lampi and Reinhart-King (Science Translational Medicine, 10(422): eaao0475, "*Targeting extracellular matrix stiffness to attenuate disease: From molecular mechanisms to clinical trials*"), повышенная жесткость тканевых ECM происходит

при патологическом прогрессировании рака, фиброза и сердечно-сосудистых заболеваний. Механические свойства, ассоциированные с этим процессом, включают фенотипически преобразованные миофибробласты, TGFβ и сшивание матрикса. Основной причиной повышенной жесткости ECM во время рака и фиброзных заболеваний является нарушение регуляции синтеза и ремоделирования матрикса активированными фибробластами, которые дедифференцировались в миофибробласты (например, CAF и FAF). Ремоделирование стромы опухоли и фиброз органа демонстрируют поразительное сходство с реакцией на заживление ран, за исключением того, что в патологическом состоянии реакция сохраняется. Миофибробласты представляют собой гетерогенную популяцию клеток с клетками-предшественниками, специфическими в отношении патологии, происходящими из нескольких источников клеток, таких как клетки костного мозга и резидентные клетки ткани. Обычно используемые маркеры миофибробластов включают альфа-актин гладких мышц (α-SMA). Как продемонстрировано в настоящем документе, высокоаффинные специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 способны снижать экспрессию ACTA2 (который кодирует α-SMA), коллагенов, а также FN (фибронектина) в исследованиях in vivo. Фибронектин играет важную роль в заякоривании LTBP-ассоциированных комплексов proTGFβ1 на матриксной структуре.

[576] Важность пути с участием TGFβ в регуляции ECM хорошо известна. Поскольку TGFβ1 (и TGFβ3) может быть механически активирован определенными интегринами (например, интегринами αv), взаимодействие интегрин-TGFβ1 стало представлять собой терапевтическую мишень. Например, моноклональное антитело к αvβ6 исследуют в отношении идиопатического фиброза легких. Однако такой подход может также нарушать передачу сигналов с участием TGFβ3, который имеет тот же интегрин-связывающий мотив, RGD, и, кроме того, такое антитело не будет эффективно блокировать TGFβ1, активированный другими способами, такими как активация, индуцированная протеазой. Для сравнения, высокоаффинные специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 могут блокировать протеазозависимую активацию TGFβ1 (фиг. 5A и 5B), а также интегрин-зависимую активацию TGFβ1 (фиг. 1-4 и 33B). Следовательно, высокоаффинные селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 могут обеспечивать более эффективные свойства. Данные, представленные в настоящем документе, вместе с предыдущей работой заявителя, подтверждают, что высокоаффинные селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 могут быть эффективными при лечении заболевания, ассоциированного с жесткостью ECM.

[577] Таким образом, настоящее изобретение предусматривает терапевтическое применение высокоаффинных селективных в отношении изоформы ингибиторов TGFβ1

при лечении заболевания, ассоциированного с жесткостью матрикса, или в способе снижения жесткости матрикса у субъекта. Такое применение предусматривает введение терапевтически эффективного количества высокоаффинного селективного в отношении изоформы ингибитора TGFβ1.

Заболевания, связанные с протеазами

[578] Активация TGFβ из его латентного комплекса может запускаться интегрином зависимым от силы образом и/или протеазами. Данные свидетельствуют о том, что определенные классы протеаз могут быть вовлечены в процесс, включая, помимо прочего, Ser/Thr протеазы, такие как калликреины, хемотрипсин, эластазы, плазмин, а также цинковые металлопротеазы семейства MMP, такие как MMP-2, MMP-9 и MMP-13, а также протеазы семейства Adam, такие как Adam10 и Adam17. MMP-2 разрушает наиболее распространенный компонент базальной мембраны, коллаген IV типа, что повышает вероятность того, что он может играть роль в регуляции TGFβ1, ассоциированной с ECM. Предполагается, что MMP-9 играет центральную роль в прогрессировании опухоли, ангиогенезе, ремоделировании стромы и метастазировании, в том числе при карциноме, такой как рак молочной железы. Таким образом, протеазозависимая активация TGFβ1 в ECM может быть важна для лечения рака.

[579] Калликреины (KLK) представляют собой сериновые протеазы, подобные трипсину или химотрипсину, которые включают плазматические калликреины и тканевые калликреины. ECM играет роль в гомеостазе тканей, выступая в качестве структурного и сигнального каркаса и барьера для подавления злокачественного роста. KLK могут играть роль в разрушении белков ECM и других компонентов, которые могут способствовать росту и инвазии опухоли. Например, KLK1 значительно активируется при некоторых формах рака молочной железы и может активировать про-MMP-2 и про-MMP-9. KLK2 активирует латентный TGFβ1, делая рак предстательной железы, прилегающую к фибробластам, благоприятным для опухолевого рака. KLK3 широко изучают в качестве диагностического маркера рака предстательной железы (PSA). KLK3 может непосредственно активировать TGFβ1 путем преобразования плазминогена в плазмин, который протеолитически расщепляет LAP, тем самым вызывая высвобождение фактора роста TGFβ1 из латентного комплекса. KLK6 может представлять собой потенциальный маркер болезни Альцгеймера.

[580] Более того, данные, приведенные в Примере 8, указывают на то, что такие протеазы могут представлять собой калликреин. Таким образом, настоящее изобретение охватывает применение специфического в отношении изоформы контекстно-независимого

ингибитора TGFβ1 в способе лечения заболевания, ассоциированного с калликреином или калликреин-подобной протеазой. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ1 представляет собой Ab3, Ab6 или их производные.

[581] Все известные активаторы TGFβ1, такие как плазмин, TSP-1 и интегрин αVβ6, непосредственно взаимодействуют с LAP. Предполагается, что протеолитическое расщепление LAP может дестабилизировать взаимодействие LAP-TGFβ, высвобождая тем самым активный TGFβ1. Было высказано предположение, что область, содержащая 54-LSKLRL-59, важна для поддержания латентности TGFβ1. Таким образом, средства (например, антитела), которые стабилизируют взаимодействие или блокируют протеолитическое расщепление LAP, могут предупреждать активацию TGFβ1.

[582] Многие из этих протеаз, ассоциированных с патологическими состояниями (например, раком), функционируют посредством различных механизмов действия. Таким образом, целевое ингибирование конкретных протеаз или комбинаций протеаз может обеспечить терапевтический эффект для лечения состояний, связанных с осью протеаза-TGFβ. Соответственно, предполагается, что ингибиторы (например, антитела к TGFβ1), которые селективно ингибируют индуцированную протеазой активацию TGFβ1, могут быть предпочтительными при лечении таких заболеваний (например, рака). Аналогичным образом, избирательное ингибирование активации TGFβ1 одной протеазой по сравнению с другой протеазой также может быть предпочтительным, в зависимости от состояния, подлежащего лечению.

[583] Плазмин представляет собой сериновую протеазу, продуцируемую в виде предшественника, называемого плазминогеном. После высвобождения плазмин попадает в кровоток и, следовательно, обнаруживается в сыворотке крови. Повышенные уровни плазмина в сыворотке, по-видимому, коррелируют с прогрессированием рака, возможно, за счет механизмов, включающих нарушение внеклеточного матрикса (например, базальной мембраны и стромальных барьеров), что способствует подвижности опухолевых клеток, инвазии и метастазированию. Плазмин может также влиять на адгезию, пролиферацию, апоптоз, питание, снабжение кислородом, образование кровеносных сосудов злокачественной опухоли и активацию VEGF (Didiasova *et al.*, *Int. J. Mol. Sci*, 2014, 15, 21229-21252). Кроме того, плазмин может способствовать миграции макрофагов в микроокружение опухоли (Philips et al., *Cancer Res.* 2011 Nov 1;71(21):6676-83 и Choong et al., *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2003, *415S*, S46-S58). Действительно, ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM) представляют собой хорошо охарактеризованные факторы онкогенеза благодаря своей способности способствовать росту, инвазии, метастазированию и ангиогенезу опухоли.

[584] Различные виды активности плазмина были в первую очередь связаны с нарушением ECM. Однако появляется все больше доказательств того, что плазмин также регулирует последующую активацию MMP и TGFβ. В частности, предполагается, что плазмин вызывает активацию TGFβ посредством протеолитического расщепления пептида, ассоциированного с латентностью (LAP), который происходит из N-концевой области продукта гена TGFβ (Horiguchi et al., *J Biochem*. 2012 Oct; 152(4):321-9), что приводит к высвобождению активного фактора роста. Поскольку TGFβ1 может способствовать прогрессированию рака, это повышает вероятность того, что индуцированная плазмином активация TGFβ может по меньшей мере частично опосредовать этот процесс.

[585] Также было продемонстрировано, что TGFβ1 регулирует экспрессию uPA, которая играет решающую роль в превращении плазминогена в плазмин (Santibanez, Juan F., *ISRN Dermatology*, 2013: 597927). Независимо было продемонстрировано, что uPA способствует прогрессированию рака (например, адгезии, пролиферации и миграции) за счет связывания со своим рецептором клеточной поверхности (uPAR) и способствует превращению плазминогена в плазмин. Более того, исследования продемонстрировали, что экспрессия uPA и/или ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) является предиктором неблагоприятного прогноза колоректального рака (D. Q. Seetoo, *et al.*, *Journal of Surgical Oncology*, vol. 82, no. 3, pp. 184–193, 2003), breast cancer (N. Harbeck *et al.*, *Clinical Breast Cancer*, vol. 5, no. 5, pp. 348–352, 2004) и рака кожи (Santibanez, Juan F., *ISRN Dermatology*, 2013: 597927). Таким образом, не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, взаимодействие между плазмином, TGFβ1 и uPA может создавать петлю положительной обратной связи, способствующую прогрессированию рака. Соответственно, ингибиторы, которые избирательно ингибируют плазмин-зависимую активацию TGFβ1, могут быть особенно подходящими для лечения рака, зависящего от сигнальной оси плазмин/TGFβ1.

[586] В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения специфические в в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, описанные в настоящем документе, включают ингибиторы, которые могут ингибировать протеазозависимую активацию TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы могут ингибировать протеазозависимую активацию TGFβ1 интегрин-независимым образом. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ингибиторы могут ингибировать активацию TGFβ1 независимо от режима активации, например, ингибировать как интегрин-зависимую активацию, так и протеазозависимую активацию TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления протеазу выбирают из группы, состоящей из сериновых протеаз, таких как калликреины, хемотрипсин, трипсин, эластазы, плазмин, а также цинковых металлопротеаз (семейство MMP), таких как MMP-2, MMP-9 и MMP-13.

[587] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы могут ингибировать индуцированную плазмином активацию TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы могут ингибировать индуцированную плазмином и интегрином активацию TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывает proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывает латентный proTGFβ1, тем самым ингибируя высвобождение зрелого фактора роста из латентного комплекса. Согласно некоторым вариантам осуществления высокоаффинный контекстно-независимый ингибитор активации TGFβ1, подходящий для применения в способе ингибирования плазмин-зависимой активации TGFβ1, представляет собой Ab6 или его производное или вариант.

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

[589] В соответствии с другим аспектом в настоящем документе предусмотрен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ предусматривает введение субъекту эффективного количества ингибитора TGFβ1 (например, антитела к TGFβ1), при этом ингибитор ингибирует индуцированную протеазой активацию TGFβ1 (например, плазмин), тем самым приводя к лечению рака у субъекта.

[590] В соответствии с другим аспектом в настоящем документе предусмотрен способ уменьшения опухолевого роста у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ предусматривает введение субъекту эффективного количества ингибитора TGFβ1 (например, антитела к TGFβ1), при этом ингибитор ингибирует индуцированную протеазой активацию TGFβ1 (например, плазмин), уменьшая тем самым рост опухоли у субъекта.

Рак/злокачественные новообразования

[591] Различные виды рака предусматривают различные виды активности TGFβ1 и их можно лечить антителами и/или композициями по настоящему раскрытию. Как используется в настоящем документе, термин «рак» относится к любому из различных злокачественных новообразований, ассоциированных с TGFβ1-положительными клетками. Такие злокачественные новообразования характеризуются пролиферацией анапластических клеток, которые имеют тенденцию инвазировать окружающие ткани и метастазировать в новые участки тела, а также относятся к патологическому состоянию, характеризующемуся такими злокачественными новообразованиями. Источник TGFβ1

может варьироваться и может включать сами злокачественные (раковые) клетки, а также их окружающие или поддерживающие клетки/ткани, включая, например, внеклеточный матрикс, различные иммунные клетки и любые их комбинации.

[592] Подтвержденная идентификация рака как «TGFβ1-положительного» не требуется для осуществления терапевтических способов, описанных в настоящем документе. Как правило, известно или предполагается на основании достоверных данных, что определенные типы рака ассоциированы с передачей сигналов с участием TGFβ1.

[593] Различные виды рака могут быть локальными (например, солидные опухоли) или системными. В контексте настоящего раскрытия термин «локализованная» (как в «локализованной опухоли») относится к анатомически изолированным или изолируемым аномалиям/поражениям, таким как солидные злокачественные новообразования, в отличие от системного заболевания (например, так называемых жидких опухолей или рака крови). Определенные виды рака, такие как определенные типы лейкоза (например, миелофиброз) и множественная миелома, например, могут иметь как локализованный компонент (например, костный мозг), так и системный компонент (например, циркулирующие клетки крови). Согласно некоторым вариантам осуществления рак может быть системным, такой как гематологические злокачественные новообразования. Различные виды рака, которые могут подлежать лечению в соответствии с настоящим раскрытием, являются TGFβ1-положительными и включают без ограничения все типы лимфом/лейкозов, карцином и сарком, таких как различные виды рака и опухоли, встречающиеся в анальном отверстии, мочевом пузыре, желчном протоке, костной ткани, головном мозге, молочной железе, шейке матки, толстой кишке/прямой кишке, эндометрии, пищеводе, глазе, желчном пузыре, голове и шее, печени, почке, гортани, легком, средостении (грудной клетке), ротовой полости, яичниках, поджелудочной железе, мужском половом члене, предстательной железе, коже, тонком кишечнике, желудке, спинном мозге, копчике, семенниках, щитовидной железе и матке. Согласно некоторым вариантам осуществления рак может представлять собой распространенный рак, такой как местнораспространенная солидная опухоль и метастатический рак.

[594] Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, охватываемые настоящим раскрытием, могут быть использованы для лечения рака, включая, без ограничения: миелофиброз, меланому, адъювантную меланому, почечно-клеточную карциному (RCC), рак мочевого пузыря, колоректальный рак (CRC), рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак анального канала, рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы (TNBC), HER2-негативный рак молочной железы, рак молочной железы с мутацией BRCA, гематологические злокачественные новообразования, немелкоклеточную карциному,

немелкоклеточный рак легких (NSCLC), мелкоклеточный рак легких (SCLC), мелкоклеточный рак легких на запущенной стадии (ES-SCLC), лимфому (классическую Ходжкина и неходжкинскую), первичную крупноклеточную В-лимфому средостения (PMBCL), Т-клеточную лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому, гистиоцитарную саркому, саркому фолликулярных дендритных клеток, саркому интердигитальных дендритных клеток, миелому, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый миелоидный лейкоз (AML), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), рак головы и шеи, рак уротелия, карциному из клеток Меркеля, рак кожи из клеток Меркеля, рак с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H), рак с дефицитом коррекционной репарации (dMMR), мезотелиому, рак желудка, рак желудочно-пищеводного соединения (GEJ), аденокарциному желудка, нейроэндокринные опухоли, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта (GIST), аденокарциному кардиального отдела желудка, рак почек, рак желчных путей, холангиокарциному, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, аденокарциному, плоскоклеточный рак, неплоскоклеточный рак, плоскоклеточный рак кожи (CSCC), рак яичников, рак эндометрия, рак маточных труб, рак шейки матки, рак брюшины, рак желудка, различные виды рака головного мозга, злокачественную глиому, глиобластому, глиосаркому, нейробластому, рак щитовидной железы, карциному коры надпочечников, внутриэпителиальную неоплазию полости рта, рак пищевода, плоскоклеточную карциному слизистой оболочки носовой полости и придаточных пазух, карциному носоглотки, рак слюнных желез, рак печени и гепатоцеллюлярный рак (HCC). Однако любой рак (например, пациенты с таким раком), при котором TGFβ1 сверхэкспрессируется или представляет собой по меньшей мере преобладающую изоформу, как определено, например, с помощью биопсии, может подлежать лечению с помощью селективного в отношении изоформы ингибитора TGFβ1 в соответствии с настоящим раскрытием.

[595] При раке TGFβ (например, TGFβ1) может оказывать как активирующее действие на рост, так и ингибирующее действие на рост. Например, при различных видах рака поджелудочной железы опухоли, вызванные SMAD4 дикого типа, могут претерпевать ингибирующий рост в ответ на TGFβ, однако по мере того, как заболевание прогрессирует, обычно присутствует конститутивно активированный рецептор II типа. Кроме того, существуют SMAD4-нулевые различные виды рака поджелудочной железы. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, их антигенсвязывающие части и/или композиции по настоящему раскрытию конструируют в целях селективного целенаправленного воздействия на компоненты путей передачи сигналов с участием TGFβ, которые функционируют однозначно при одной или нескольких формах рака. Лейкозы, или

злокачественные новообразования крови или костного мозга, которые характеризуются патологической пролиферацией белых кровяных клеток, т.е., лейкоцитов, можно разделить на четыре основные группы, в том числе острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый миелогенный лейкоз, или острый миелоидный лейкоз (AML) (AML с транслокациями между хромосомой 10 и 11 [t(10, 11)], хромосомой 8 и 21 [t(8;21)], хромосомой 15 и 17 [t(15;17)] и инверсиями в хромосоме 16 [inv(16)]; AML с мультилинейной дисплазией, который включает пациентов, которые ранее имели миелодиспластический синдром (MDS) или миелопролиферативный синдром, который трансформируется в AML; AML и миелодиспластический синдром (MDS) на фоне лечения, эта категория включает пациентов, которые ранее получали химиотерапию и/или лучевую терапию и у которых затем возникает AML или MDS; d) AML, не характеризующийся иным образом, который включает подтипы AML, которые не разделяются на вышеуказанные категории; и e) острые лейкозы сомнительной линии дифференцировки, которые возникают в случае, когда лейкозные клетки нельзя классифицировать ни как миелоидные, ни как лимфоидные клетки, или в случае, когда присутствуют оба типа клеток); и хронический миелогенный лейкоз (CML).

[596] Согласно некоторым вариантам осуществления любой из указанных выше TGFβ1-положительных видов рака также может быть TGFβ3-положительным. Согласно некоторым вариантам осуществления опухоли, которые являются как TGFβ1-положительными, так и TGFβ3-положительными, могут быть TGFβ1/TGFβ3-кодоминантными. Согласно некоторым вариантам осуществления такой рак представляет собой карциному, включающую солидную опухоль. Согласно некоторым вариантам осуществления такие опухоли представляют собой карциному молочной железы. Согласно некоторым вариантам осуществления карцинома молочной железы может иметь трижды негативный генотип (трижды негативный рак молочной железы). Согласно некоторым вариантам осуществления субъекты с TGFβ1-положительным раком имеют повышенные уровни MDSC. Например, такие опухоли могут содержать MDSC, рекрутированные в участок опухоли, что приводит к увеличению количества инфильтратов MDSC. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекты с раком молочной железы демонстрируют повышенные уровни С-реактивного белка (CRP), воспалительного маркера, ассоциированного с рецидивом и неблагоприятным прогнозом. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекты с раком молочной железы демонстрируют повышенные уровни IL-6.

[597] Селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 по настоящему изобретению можно применять для лечения пациентов, страдающих хроническим

миелоидным лейкозом, который представляет собой заболевание стволовых клеток, при котором онкопротеин BCR/ABL считается важным для аномального роста и накопления неопластических клеток. Иматиниб представляет собой одобренное лекарственное средство для лечения этого состояния; однако значительная часть пациентов с миелоидным лейкозом демонстрирует устойчивость к иматинибу. Ингибирование TGFβ1, достигаемое с помощью ингибитора, такого как описанные в настоящем документе, может потенцировать репопуляцию/экспансию для того, чтобы противодействовать аномальному росту и накоплению неопластических клеток, вызванных BCR/ABL, тем самым обеспечивая клинический эффект.

[598] Специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, можно применять для лечения множественной миеломы. Множественная миелома представляет собой рак B-лимфоцитов (например, плазматических клеток, плазмобластов, B-клеток памяти), который развивается и экспандирует в костном мозге, вызывая деструктивные поражения костей (т.е., остеолитическое поражение). Обычно заболевание проявляется усиленной резорбцией костной ткани остеокластами, подавлением дифференцировки остеобластов (например, остановкой дифференцировки) и нарушением образования кости, что частично характеризуется остеолитическими поражениями, остеопенией, остеопорозом, гиперкальциемией, а также плазмоцитомой, тромбоцитопенией, нейтропенией и нейропатией. Терапия TGFβ1-селективным контекстно-независимым ингибитором может быть эффективной для облегчения одного или нескольких таких клинических проявлений или симптомов у пациентов. Ингибитор TGFβ1 можно вводить пациентам, которые получают дополнительную терапию или виды терапии для лечения множественной миеломы, включая те, которые перечислены в другом разделе настоящего документа. Согласно некоторым вариантам осуществления множественную миелому можно лечить ингибитором TGFβ1 (таким как специфический в отношении изоформы контекстно-независимый ингибитор) в комбинации с ингибитором миостатина или ингибитором IL-6. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ1 можно применять в сочетании с традиционными видами терапии для лечения множественной миеломы, такими как бортезомиб, леналидомид, карфилзомиб, помалидомид, талидомид, доксорубицин, кортикостероиды (например, дексаметазон и преднизон), химиотерапия (например, мелфалан), лучевая терапия, трансплантация стволовых клеток, плитидепсин, элотузумаб, иксазомиб, маситиниб и/или панобиностат.

[599] Типы карцином, которые можно лечить с помощью способов по настоящему изобретению, включают без ограничения папиллому/карциному, хориокарциному, опухоль

эндодермального синуса, тератому, аденому/аденокарциному, меланому, фиброму, липому, лейомиому, радбомиому, мезотелиому, ангоиму, остеому, хондрому, глиому, лимфому/лейкоз, плоскоклеточную карциному, мелкоклеточную карциному, крупноклеточные недифференцированные карциномы, базальноклеточную карциному и синоназальную недифференцированную карциному.

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

[601] Селективные в отношении изоформы контекстно-независимые ингибиторы активации TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, могут подходить для лечения злокачественных новообразований с участием клеток, происходящих из нервного гребня. Различные виды рака линии дифференцировки нервного гребня (т.е., опухоли, происходящие из нервного гребня) включают без ограничения: меланому (рак меланоцитов), нейробластому (рак предшественников симпатоадреналовой системы), ганглионеврому (рак ганглиев периферической нервной системы), медуллярную карциному щитовидной железы (рак С-клеток щитовидной железы), феохромоцитому (рак хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников) и MPNST (рак шванновских клеток). Согласно некоторым вариантам осуществления антитела и способы по настоящему раскрытию можно применять для лечения одного или нескольких различных видов рака или связанных с раком состояний, которые могут включать без ограничения рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак почки, рак молочной железы, злокачественную меланому и глиобластомы (Schlingensiepen et al., 2008; Ouhtit et al., 2013).

[602] В нормальных условиях регуляторные Т-клетки (Treg) представляют собой небольшую подгруппу общей популяции CD4-положительных лимфоцитов и играют ключевую роль в поддержании иммунной системы в гомеостазе. Однако почти при всех различных видах рака количество Treg заметно повышается. Хотя Treg играют важную роль в подавлении иммунных ответов у здоровых индивидуумов, повышенное количество Treg при раке ассоциировано с неблагоприятным прогнозом. Повышенные уровни Treg при раке могут ослаблять противораковый иммунитет хозяина и могут способствовать

прогрессированию опухоли, метастазированию, рецидиву опухоли и/или устойчивости к лечению. Например, различные виды асцита при раке яичников человека инфильтрированы Foxp3+ GARP+ Treg (Downs-Canner et al., Nat Commun. 2017, 8: 14649). Аналогичным образом, Treg положительно коррелировали с более иммуносупрессорным и более агрессивным фенотипом при распространенной гепатоцеллюлярной карциноме (Kalathil et al., Cancer Res. 2013, 73(8): 2435-44). Treg могут подавлять пролиферацию эффекторных Т-клеток (фиг. **26B**). Кроме того, Treg вызывают контактно-зависимое ингибирование иммунных клеток (например, наивных CD4+ Т-клеток) посредством продуцирования TGFβ1 (см., например, фиг. **26A**). Поэтому для борьбы с опухолью предпочтительно ингибировать Treg для того, чтобы могло быть доступно достаточное количество эффекторных Т-клеток для оказания противоопухолевых эффектов.

[603] Все больше доказательств предполагают роль макрофагов в прогрессировании опухоли/рака. Настоящее изобретение охватывает идею о том, что это частично опосредовано активацией TGFβ1 в патологическом окружении, таком как TME. Моноциты костного мозга (например, CD11 +) рекрутируются в очаги опухоли в ответ на цитокины/хемокины опухолевого происхождения (такие как CCL2, CCL3 и CCL4), при этом моноциты подвергаются дифференцировке и поляризации для приобретения предракового фенотипа (например, M2-смещенные или M2-подобные макрофаги, TAM). Как было продемонстрировано ранее (WO 2018/129329), моноциты, выделенные из PBMC человека, могут быть индуцированы поляризацией в различные подтипы макрофагов, например, M1 (предфибротический, противораковый) и M2 (предраковый). Большинство TAM во многих опухолях являются M2-смещенными. Среди M2-подобных макрофагов подтипы M2c и M2d, но не M1, экспрессируют повышенный уровень LRRC33 на клеточной поверхности. Более того, макрофаги могут быть дополнительно искажены или активированы воздействием определенных цитокинов, таких как M-CSF, что приводит к заметному увеличению экспрессии LRRC33, что совпадает с экспрессией TGFβ1. Также наблюдались повышенные уровни циркулирующего M-CSF (т.е., концентрации M-CSF в сыворотке крови) у пациентов с миелопролиферативным заболеванием (например, миелофиброзом). Как правило, опухоли с высоким содержанием макрофагов (TAM) и/или инфильтратом MDSC ассоциированы с неблагоприятным прогнозом. Аналогичным образом, повышенные уровни M-CSF также указывают на неблагоприятный прогноз. Таким образом, высокоаффинный селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1, такой как те, которые охвачены настоящим документом, можно применять для лечения рака, который характеризуется повышенными уровнями предраковых макрофагов и/или MDSC. Область LRRC33 ингибитора может по меньшей мере частично опосредовать его

ингибирующие эффекты против ассоциированных с заболеванием иммуносупрессорных миелоидных клеток, например, макрофагов M2 и MDSC.

[604] Высокая распространенность опухолеассоциированных M2-подобных макрофагов воспроизводится в моделях сингенных опухолей мышей, описанных в настоящем документе. В опухолях MBT-2, например, почти 40% CD45-положительных клеток, выделенных из подтвержденной опухоли, представляют собой макрофаги M2 (фиг. **28B**). Они снижены наполовину у животных, обработанных комбинацией высокоаффинного селективного в отношении изоформы TGFβ1 и антитела к PD-1. Для сравнения, у одних и тех же животных не наблюдается значительного изменения количества опухолеассоциированных макрофагов M1. Подобно макрофагам M2, опухолеассоциированные MDSC также повышаются в подтвержденных опухолях (приблизительно 10-12% CD45+ клеток) и заметно снижаются (до незначительных уровней) за счет ингибирования как PD-1, так и TGFβ1 у обработанных животных (фиг. 28B). Как раскрыто в настоящего документе, большинство инфильтрирующих опухоль макрофагов M2 и MDSC экспрессируют комплекс LRRC33 и/или LRRC33-proTGFβ1 на клеточной поверхности (фиг. **28C** и **28D**). Интересно, что экспрессия LRRC33 (или комплекса LRRC33-proTGFβ1) на клеточной поверхности, по-видимому, значительно регулируется. Высокоаффинный селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1, Ab6, способен быстро интернализоваться в клетках, экспрессирующих LRRC33 и proTGFβ1, и скорость интернализации, достигаемая с помощью Ab6, значительно выше, чем в случае с референтным антителом, которое распознает LRRC33 на клеточной поверхности (фиг. **6**). Аналогичные результаты получены для первичных макрофагов человека. Эти наблюдения демонстрируют, что Ab6 может способствовать интернализации при связывании со своей мишенью LRRC33-proTGFβ1, тем самым удаляя LRRC33-содержащие комплексы с клеточной поверхности. Таким образом, попадание в мишень с помощью высокоаффинного селективного в отношении изоформы ингибитора TGFβ1 (такого как Ab6) может индуцировать антителозависимое подавление активности белка-мишени (например, ассоциированных с клетками комплексов proTGFβ1). В патологических очагах это может снижать доступность активируемых уровней латентного LRRC33-proTGFβ1. Следовательно, селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 могут ингибировать область LRRC33 TGFβ1 посредством двойных механизмов действия: i) блокирования высвобождения зрелого фактора роста из латентного комплекса; и, ii) удаления комплексов LRRC33-proTGFβ1 с клеточной поверхности посредством интернализации. В микроокружении опухоли антитела могут нацеливаться на ассоциированные с клетками латентные комплексы proTGFβ1, усиливая ингибирующие

эффекты в отношении клеток-мишеней, таких как макрофаги M2 (например, TAM), MDSC и Treg. Фенотипически это иммуносупрессорные клетки, способствующие иммуносупрессорному микроокружению опухоли, которое по меньшей мере частично опосредовано путем с участием TGFβ1. Учитывая, что многие опухоли обогащены этими клетками, антитела, которые способны нацеливаться на несколько звеньев функции TGFβ1, должны обеспечивать функциональное преимущество.

[605] Известно, что многие виды рака у человека вызывают повышенные уровни MDSC у пациентов по сравнению со здоровым контролем (см., например, в работе Elliott et al. (2017) "*Human tumor-infiltrating myeloid cells: phenotypic and functional diversity*" Frontiers in Immunology, Vol. 8, Article 86). Эти виды рака у человека включают без ограничения: рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак молочной железы, глиобластому, гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак легких, меланому, NSCL, рак яичников, рак поджелудочной железы и почечно-клеточную карциному. Повышенные уровни MDSC могут быть обнаружены в биологических образцах, таких как мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и образцы тканей (например, биоптат опухоли). Например, частота или изменения количества MDSC могут быть измерены как: процент (%) от общего количества PBMC, процент (%) CD14+ клеток, процент (%) CD45+ клеток; процент (%) мононуклеарных клеток, процент (%) всех клеток, процент (%) CD11b+ клеток, процент (%) моноцитов, процент (%) нелимфоцитарных MNC, процент (%) KLA-DR клеток, используя подходящие маркеры клеточной поверхности (фенотип).

[606] С другой стороны, инфильтрация макрофагов в опухоль также может свидетельствовать об эффективности терапии. Как проиллюстрировано на фиг. **23**, **24** и **27B**, в опухоли эффективно проникают эффекторные Т-клетки (например, CD8+ Т-клетки) после лечения комбинацией ингибитора контрольной точки и контекстно-независимого ингибитора TGFβ1. Внутриопухолевые эффекторные Т-клетки могут приводить к рекрутингу фагоцитарных моноцитов/макрофагов, которые устраняют остатки клеток.

[607] Как следует из фиг. **23**, комбинация антитела к PD-1 и ингибитора TGFβ1 приводила к значительной миграции/экспансии CD8 Т-клеток по всей опухоли по сравнению с обработкой одним антителом к PD-1. Соответственно, значительное повышение экспрессии эффекторных генов CD8 может быть достигнуто с помощью комбинированного лечения. Таким образом, ингибиторы TGFβ1 по настоящему изобретению можно применять для стимуляции инфильтрации эффекторных Т-клеток в опухоли.

[608] Кроме того, наблюдается обширная инфильтрация/экспансия опухоли F4/80-положительными макрофагами (см. фиг. **24**). Это может указывать на то, что макрофаги M1 (противоопухолевые) устраняют остатки раковых клеток, образованные цитотоксическими клетками, и это предположительно является прямым следствием ингибирования TGFβ1. Как более подробно описано в разделе Примеры настоящем документе, эти инфильтрирующие опухоль макрофаги идентифицируются преимущественно как макрофаги, не являющиеся M2, из-за отсутствия в них экспрессии CD163, что указывает на то, что циркулирующие моноциты рекрутируются в очаг опухоли после обработки ингибитором контрольной точки и ингибитором TGFβ1 и дифференцируются в макрофаги M1, и это наблюдение сопровождается заметной миграцией CD8+ Т-клеток в очаг опухоли. Таким образом, ингибиторы TGFβ1 по настоящему изобретению можно применять для увеличения макрофагов, не являющихся M2, ассоциированных с опухолью.

[609] В последнее время терапия блокадой контрольных точек (CBT) стала стандартом лечения ряда типов рака (см., например, фиг. **20B**). Несмотря на значительный прогресс в иммунотерапии рака, первичная устойчивость к CBT остается основной неудовлетворенной потребностью для пациентов; большинство онкологических заболеваний у пациентов по-прежнему не реагируют на ингибирование PD-(L)1. Ретроспективный анализ рака уротелия и опухолей меланомы недавно выявил активацию TGFβ как потенциальный фактор первичной устойчивости, весьма вероятно в результате нескольких механизмов, включая исключение цитотоксических Т-клеток из опухоли, а также их экспансию в микроокружение опухоли (иммунное исключение). Эти наблюдения и последующая доклиническая проверка показали, что ингибирование пути TGFβ является перспективным путем преодоления первичной устойчивости к CBT. Однако терапевтическое нацеливание на путь с участием TGFβ затруднялся дозолимитирующей предклинической кардиотоксичностью, скорее всего, в результате ингибирования передачи сигналов от одной или нескольких изоформ TGFβ.

[610] Многие опухоли не имеют первичного ответа на CBT. В этом сценарии CD8+ Т-клетки, как правило, исключаются из паренхимы опухоли, что позволяет предположить, что опухоли могут включать иммуномодулирующие функции передачи сигналов TGFβ для создания иммуносупрессорного микроокружения. Эти выводы на основе ретроспективного клинического анализа образцов опухоли послужили обоснованием для исследования роли передачи сигналов с участием TGFβ в первичной устойчивости к CBT.

[611] На основании результатов настоящего исследования можно сделать несколько ключевых выводов. Во-первых, анализ экспрессии генов данных TCGA показывает, что TGFβ1 является наиболее распространенной изоформой в большинстве

типов опухолей человека и, следовательно, является наиболее вероятным фактором передачи сигналов с участием TGFβ, следовательно, иммуносупрессорной причиной первичной устойчивости к СВТ в этих опухолях.

[612] Во-вторых, избирательное ингибирование активации TGFβ1 оказывается достаточным для преодоления первичной устойчивости к СВТ. Путем нацеливания на продомен латентного TGFβ1 высокоаффинный селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1 достигает исключительной изоформной специфичности и ингибирует латентную активацию TGFβ1 во всех известных молекулярных контекстах. Фармакологическая оценка одного такого антитела в моделях сингенных опухолей продемонстрировала, что обработка этим антителом достаточна для того, чтобы сделать опухоли, устойчивые к антителам к PD-1, восприимчивыми к терапии блокадой контрольных точек. Важно отметить, что противоопухолевая эффективность комбинации антитела к PD-1/ингибитора к TGFβ1 была продемонстрирована в трех различных типах опухолей, включая одну модель, в которой TGFβ1 не был единственной изоформой TGFβ, присутствующей в опухоли. Это предполагает, что в микроокружении опухоли TGFβ1, вероятно, играет иммуномодулирующую роль, тогда как другие изоформы могут не иметь отношения к этой биологической активности. Это наблюдение открывает возможность того, что селективное ингибирование TGFβ1 может иметь терапевтический потенциал в преодолении первичной устойчивости к СВТ в широком спектре различных видов рака, независимо от экспрессии других изоформ TGFβ.

[613] В-третьих, избирательное ингибирование активности пути, контролируемого TGFβ1, приводит к значительному повышению доклинической безопасности по сравнению с широким ингибированием активности всех изоформ. Плейотропные эффекты, связанные с широким ингибированием пути с участием TGFβ, затрудняют терапевтическое нацеливание на путь с участием TGFβ. Большинство экспериментальных терапевтических средств на сегодняшний день (например, галунисертиб, LY3200882, фрезолимумаб) не обладают селективностью в отношении одной изоформы TGFβ, что потенциально способствует дозоограничивающей токсичности, наблюдаемой в доклинических и клинических исследованиях. Генетические данные, полученные на основе мышей с нокаутом и мутаций потери функции у человека в генах TGFβ2 или TGFβ3 предполагают, что кардиотоксичность, наблюдаемая с неспецифическими ингибиторами TGFβ, может быть связана с ингибированием TGFβ2 или TGFβ3. В настоящем раскрытии указывается, что избирательное ингибирование активации TGFβ1 таким антителом имеет улучшенный профиль безопасности и является достаточным для того, чтобы вызвать устойчивые

противоопухолевые ответы в сочетании с блокадой PD-1, что позволяет оценить эффективность ингибитора TGFβ1 при клинически контролируемых уровнях доз.

[614] Для анализа иммунологических процессов, ассоциированных с противоопухолевым иммунитетом во время комбинированного лечения ингибитором TGFβ1/антителом к PD-1, был проведен более подробный анализ ответов в модели рака мочевого пузыря MBT-2. Одновременная блокада активности PD-1 и TGFβ1 вызывала значительное изменение внутриопухолевой иммунной структуры, в значительной степени обусловленное 10-кратным увеличением количества CD8+ Т-клеток. Эти CD8+ Т-клетки, вероятно, участвовали в уничтожении опухолевых клеток, поскольку ключевые цитолитические гены, перфорин и гранзим B, также были активированы в опухолях при комбинированном лечении. Примечательно, что значительное обогащение Treg-клеток при комбинированной терапии антителом к PD-1/ингибитором TGFβ1 было несколько неожиданным, учитывая важность передачи сигналов с участием TGFβ для поддержания периферических Treg. Однако, поскольку Treg-клетки рекрутируются к очагам воспаления, их количественное повышение можно интерпретировать как маркер устойчивого иммунного ответа. Тем не менее, CD8+ Т-клетки были способны принимать активированный фенотип и вызывать значительный противоопухолевый ответ, несмотря на повышение количества Treg-клеток. Возможное объяснение может заключаться в том, что Treg-клетки не способствуют в значительной степени иммуносупрессорному микроокружению опухоли MBT-2 и что другие популяции супрессорных иммунных клеток, например, миелоидные клетки, играют более важную роль. В качестве альтернативы, но не исключая эту возможность, учитывая, что TGFβ1 является ключевым медиатором контролируемой Treg иммуносупрессии, присутствие ингибитора TGFβ1 также может устранять эту активность, несмотря на повышение количества Treg.

[615] Неожиданный результат, представленный в настоящем документе, включает гистологическое наблюдение тесной ассоциации CD8+ Т-клеток с CD31+ сосудистой сетью опухоли. Этот образец обогащения поддерживает гипотезу о том, что ключевой путь проникновения Т-клеток в опухоль проходит через сосудистую сеть опухоли и что клетки начинают мигрировать наружу радиально в опухоль, как только они выходят из кровеносных сосудов опухоли. Mariathasan et al. обнаружили, что CD8+ Т-клетки, по-видимому, накапливаются по ходу коллагенового матрикса и богатого фибробластами слоя на переднем крае опухоли в модели рака молочной железы EMT-6, что привело к предположению, что этот матрикс способствовал исключению Т-клеток. В отличие от этого наблюдения, закономерное обнаружение плотной фибробластической области возле переднего края опухолей MBT-2 было невозможно. Наблюдение заявителем в отношении

обогащения Т-клеток в непосредственной близости от сосудистой сети (например, периваскулярное обогащение) предполагает, что, помимо ассоциированного с раком слоя фибробластов, иммунное исключение также может быть вызвано TGFβ1-восприимчивыми эндотелиальными клетками сосудов или другими клетками в непосредственной близости к эндотелию. В соответствии с возможностью того, что передача сигналов TGFβ1 может влиять на функцию эндотелия, наблюдение заявителя включает то, что окрашивание фосфо-SMAD3 в контрольных опухолях было наиболее значительным в ядрах внутри, по-видимому, эндотелиальных клеток сосудов опухоли. Это окрашивание было восприимчивым к селективному ингибированию TGFβ1, что позволяет предположить, что эти клетки отвечают на TGFβ1 и могут играть ключевую роль в обеспечении иммунного исключения, возможно, посредством влияния на экстравазацию Т-клеток посредством регуляции целостности сосудистого барьера. Кроме того, было описано, что ассоциированные с опухолью макрофаги находятся в непосредственной близости от сосудистой сети опухоли и могут участвовать в создании иммунно-исключенного микроокружения опухоли либо путем активации TGFβ1, либо путем высвобождения других иммуносупрессорных поверхностных белков или секретируемых факторов в сосудистой сети или рядом с ней. Вероятно, что существует множество путей проникновения Т-клеток в опухоль, и лучшее понимание этих механизмов будет способствовать идентификации новых терапевтических мишеней или даст информацию о возможных механизмах устойчивости опухоли.

[616] Помимо ожидаемого и наблюдаемого воздействия в отношении расположения цитотоксических Т-клеток в опухолях, обработка комбинацией ингибитор TGFβ1/антитело к PD-1 также благотворно влияет на иммуносупрессорный миелоидный компартмент. Миелоидные клетки CD11b+ составляли почти 80% иммунного инфильтрата в необработанных опухолях MBT-2, но их представительство снижалось до менее 40% при комбинированной обработке. Это было полностью обусловлено потерей M2-подобных иммуносупрессорных макрофагов и еще более значительным снижением MDSC, в то время как популяция провоспалительных M1-подобных макрофагов оставалась неизменной по представленности. Механизм, с помощью которого комбинированная обработка вызывает специфическое сокращение иммуносупрессорных миелоидных клеток, неясен, как и роль передачи сигналов с участием TGFβ1 в рекрутинге, развитии или поддержании этих клеток в микроокружении опухоли. Известно, что передача сигналов с участием TGFβ, среди других факторов, поляризует макрофаги в M2-подобные. Кроме того, есть данные, позволяющие предположить, что TGFβ частично отвечает за развитие MDSC и приобретение супрессорных функций. Кроме того, вполне вероятно, что миграция Т-

клеток, секретирующих IFNγ, в сочетании с измененным микроокружением опухоли способствует как реполяризации, так и уменьшению направленной миграции иммуносупрессорных миелоидных клеток. Независимо от лежащего в основе механизма, снижение количества внутриопухолевых иммуносупрессорных миелоидных клеток было бы весьма желательным как часть подхода к иммунотерапии опухолей, поскольку наличие этой популяции клеток коррелирует с неблагоприятным прогнозом пациента и устойчивостью к терапии блокадой контрольных точек. Следовательно, терапевтическая стратегия, которая включает нацеливание на эти важные типы иммуносупрессорных клеток, может иметь больший эффект, чем нацеливание на один тип иммуносупрессорных клеток (т.е., только на Treg-клетки) в микроокружении опухоли. Таким образом, ингибиторы TGFβ1 по настоящему изобретению можно применять для уменьшения количества опухолеассоциированных иммуносупрессивных клеток, таких как макрофаги M2 и MDSC.

[617] Как упоминалось ранее, важно отметить, что TGFβ1, вероятно, экспрессируется несколькими типами клеток в микроокружении опухоли, включая Treg-клетки, супрессорные миелоидные клетки, фибробласты, а также опухолевые клетки. Каждый из этих клеточных источников продуцирует TGFβ1 в разных LLC: активированные Treg-клетки экспрессируют LLC GARP на своей поверхности; супрессорные миелоидные клетки экспрессируют LLC LRRC33 на своей поверхности, и фибробласты, вероятно, экспрессируют и депонируют LLC LTBP в окружающий внеклеточный матрикс. Вероятно, что каждый из этих источников «активируемого» TGFβ1 может играть роль в обеспечении иммунного исключения и подавления иммунитета в опухоли, и что относительный вклад каждого источника может варьироваться в зависимости от типа опухоли. Интересно, что профили мРНК опухолей MBT-2 и EMT6, использованные в этих исследованиях, показали, что LRRC33 и LTBP1 являются наиболее экспрессируемыми компонентами LLC, а опухоли Cloudman S91, по-видимому, экспрессируют исключительно LRRC33 (фиг. **20H**). Таким образом, выраженные противоопухолевые эффекты комбинации TGFβ1-селективный ингибитор/антитело к PD-1 в этих моделях, наряду с продемонстрированной способностью ингибитора TGFβ1, описанного в настоящем документе, эффективно блокировать активацию TGFβ1 во всех известных контекстах LLC, настоятельно предполагают, что селективное ингибирование специфических LLC (например, GARP на Treg-клетках) может быть недостаточным для создания максимального противоопухолевого ответа в некоторых опухолях.

[618] Таким образом, доклинические исследования и результаты, представленные в настоящем документе, демонстрируют, что высокоспецифическое ингибирование

активации TGFβ1 позволяет иммунной системе хозяина преодолеть ключевой механизм первичной устойчивости к терапии блокадой контрольных точек, избегая при этом ранее признанных токсических эффектов более широкого ингибирования TGFβ, которые представляли собой ключевое ограничение для клинического применения. Результаты, раскрываемые в настоящем документе, предполагают, что лечение высокоаффинным ингибитором TGFβ1 может значительно увеличить число пациентов, для которых может быть эффективной терапия блокадой контрольных точек.

[619] Соответственно, как продемонстрировано в разделе Примеры в настоящем документе, высокоаффинные селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 можно применять для противодействия первичной устойчивости к СВТ, тем самым делая опухоль/рак более восприимчивыми к СВТ. Такие эффекты могут быть применимы для лечения широкого спектра типов злокачественных новообразований, где рак/опухоль являются TGFβ1-положительными. Согласно некоторым вариантам осуществления такая опухоль/рак могут дополнительно экспрессировать дополнительную изоформу, такую как TGFβ3. Неограничивающие примеры последней могут включать определенные типы карциномы, такие как рак молочной железы.

[620] Соответственно, настоящее изобретение предусматривает предпочтительные критерии выбора для идентификации или выбора пациента или популяций/субпопуляций пациентов, для которых высокоаффинные контекстно-независимые ингибиторы TGFβ1, вероятно, принесут клинический эффект. Согласно некоторым вариантам осуществления подходящие фенотипы опухолей человека включают следующее: i) продемонстрировано, что группа (подгруппа) реагирует на СВТ (например, блокаду оси PD-(L)1); ii) доказательство иммунного исключения; и/или iii) доказательство экспрессии TGFB1 и/или передачи сигналов с участием TGFβ. Под этот профиль подходят различные типы рака, включая, например, меланому и рак мочевого пузыря.

[621] Как упоминалось выше, контекстно-независимые ингибиторы активации TGFβ1 можно применять при лечении меланомы. Типы меланомы, которые можно лечить такими ингибиторами, включают без ограничения: злокачественное лентиго; меланому типа злокачественного лентиго; меланому поверхностного распространения; акральную лентигинозную меланому; меланома слизистой оболочки; узловую меланому; полиповидную меланому и десмопластическую меланому. Согласно некоторым вариантам осуществления меланома представляет собой метастатическую меланому.

[622] Совсем недавно ингибиторы иммунных контрольных точек стали использоваться для эффективного лечения пациентов с распространенной меланомой. В частности, антитела к белку запрограммированной клеточной смерти (PD)-1 (например,

ниволумаб и пембролизумаб) в настоящее время стали стандартом лечения определенных типов рака, таких как распространенная меланома, которые продемонстрировали значительную активность и устойчивый ответ с управляемым профилем токсичности. Однако эффективное клиническое применение антагонистов PD-1 затруднено в результате высокого уровня врожденной устойчивости (~ 60-70%) (см. Hugo et al. (2016) Cell 165: 35-44), демонстрируя, что текущие проблемы по-прежнему включают вопросы выбора пациентов и предикторов ответа и устойчивости, а также оптимизацию комбинированных стратегий (Perrot et al. (2013) Ann Dermatol 25(2): 135-144). Более того, исследования продемонстрировали, что приблизительно у 25% пациентов с меланомой, которые первоначально отвечали на терапию антителом к PD-1, в конечном итоге развивалась приобретенная устойчивость (Ribas et al. (2016) JAMA 315: 1600-9).

[623] Количество инфильтрирующих опухоль CD8+ Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и/или CTLA-4, по-видимому, является ключевым показателем успеха при ингибировании контрольных точек, а блокада как PD-1, так и CTLA-4 может повышать количество инфильтрирующие Т-клетки. Однако у пациентов с более высоким присутствием опухолеассоциированных макрофагов противораковые эффекты CD8 клеток могут быть подавлены.

[624] Предполагается, что клетки, экспрессирующие LRRC33, такие как миелоидные клетки, включая предшественники миелоидов, MDSC и TAM, могут создавать или поддерживать иммуносупрессорную среду (такую как TME и миелофиброзный костный мозг) путем ингибирования Т-клеток (например, истощения Т-клеток), таких как CD4 и/или CD8 Т-клетки, которые могут по меньшей мере частично подчеркивать наблюдаемую устойчивость к антителу к PD-1 в определенных группах пациентов. Действительно, данные свидетельствуют о том, что устойчивость к монотерапии антителом к PD-1 характеризовалась неспособностью накапливать цитотоксические CD8+ Т-клетки и снижением соотношения Teff/Treg. Примечательно, что авторы настоящего изобретения обнаружили, что существует бифуркация среди определенных онкологических пациентов, таких как популяция пациентов с меланомой, в отношении уровней экспрессии LRRC33: одна группа демонстрирует высокую экспрессию LRRC33 ($LRRC33^{high}$), в то время как другая группа демонстрирует относительно низкую экспрессию LRRC33 ($LRRC33^{low}$). Таким образом, настоящее изобретение предусматривает представление о том, что популяция пациентов с $LRRC33^{high}$может представлять тех, кто неэффективно реагирует на терапию ингибиторами иммунных контрольных точек или устойчив к ней. Соответственно, средства, которые ингибируют LRRC33, такие как те, что описаны в настоящем документе, могут быть особенно пригодными для лечения рака, такого как меланома, лимфома и

миелопролиферативные нарушения, которые устойчивы к терапии ингибиторами контрольных точек (например, антитело к PD-1).

[625] Согласно некоторым вариантам осуществления рак/опухоль по своей природе устойчивы к ингибитору иммунной контрольной точки или не реагирует на него (например, первичная устойчивость). В качестве лишь одного примера определенные лимфомы, по-видимому, неэффективно реагируют на ингибирование иммунных контрольных точек, такое как терапия антителом к PD-1. Аналогичным образом, известно, что часть популяции пациентов с меланомой проявляет устойчивость к ингибиторам иммунных контрольных точек. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы настоящего изобретения предполагают, что это может быть по меньшей мере частично обусловлено активацией сигнальных путей с участием TGFβ1, которые могут создавать иммуносупрессорное микроокружение, в котором ингибиторы контрольных точек не могут проявлять свои эффекты. Ингибирование TGFβ1 может сделать такой рак более восприимчивым к терапии ингибиторами контрольных точек. Неограничивающие примеры типов рака, для которых может наблюдаться эффект от комбинации ингибитора иммунных контрольных точек и ингибитора TGFβ1, включают в себя: миелофиброз, меланому, почечно-клеточную карциному, рак мочевого пузыря, рак толстой кишки, гематологические злокачественные новообразования, немелкоклеточную карциному, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), лимфому (классическую и неходжкинскую), рак головы и шеи, рак уротелия, рак с высокой микросателлитной нестабильностью, рак с дефицитом коррекционной репарации, рак желудка, рак почек и гепатоцеллюлярный рак. Однако любой рак (например, пациенты с таким раком), при котором TGFβ1 сверхэкспрессируется или представляет собой преобладающую изоформу по сравнению с TGFβ2/3, как определено, например, биопсией, можно лечить селективным в отношении изоформы ингибитором TGFβ1 в соответствии с настоящим раскрытием.

[626] Согласно некоторым вариантам осуществления рак/опухоль со временем становится устойчивым. Это явление называется приобретенной устойчивостью. Подобно первичной устойчивости, согласно некоторым вариантам осуществления приобретенная устойчивость по меньшей мере частично опосредована TGFβ1-зависимыми путями, специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, описанные в настоящем документе, могут быть эффективными для восстановления противоракового иммунитета в этих случаях. Ингибиторы TGFβ1 по настоящему изобретению можно применять для снижения риска рецидива опухоли. Ингибиторы TGFβ1 по настоящему изобретению можно применять для усиления устойчивости эффекта терапии рака, такой как CBT. Термин «устойчивость эффекта», используемый в контексте видов лечения, относится к времени

между клиническими эффектами (например, контролем опухоли) и повторным ростом опухоли (например, рецидивом). Предположительно, устойчивость эффекта и рецидив могут коррелировать со вторичной или приобретенной в устойчивостью, когда терапия, на которую первоначально ответил пациент, перестает работать. Таким образом, ингибиторы TGFβ1 по настоящему изобретению можно применять для увеличения продолжительности времени, в течение которого терапия рака остается эффективной. Ингибиторы TGFβ1 по настоящему изобретению можно применять для снижения вероятности развития приобретенной устойчивости ответивших на терапию. Ингибиторы TGFβ1 по настоящему изобретению можно применять для увеличения выживаемости пациентов без прогрессирования заболевания.

[627] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы TGFβ1 по настоящему изобретению можно применять для улучшения показателей или соотношений полных или частичных ответов среди ответивших на терапию рака. Обычно даже при типах рака, где показатели ответа на терапию рака (например, CBT) относительно высоки (например, $\geq$ 35%), показатели CR являются довольно низкими. Следовательно, ингибиторы TGFβ1 по настоящему изобретению применяют для увеличения доли пациентов с полным ответом на терапию в популяции ответивших на терапию.

[628] Кроме того, ингибиторы также могут быть эффективными для усиления или увеличения степени частичных ответов среди частично ответивших на терапию.

[629] Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированная терапия, включающая ингибитор контрольной иммунной точки и ингибитор LRRC33 (например, описанные в настоящем документе), может быть эффективной для лечения такого рака. Кроме того, высокий уровень LRRC33-положительного клеточного инфильтрата в опухолях или других участках/тканях с аномальной клеточной пролиферацией может служить биомаркером иммуносупрессии хозяина и устойчивости к контрольным иммунным точкам. Аналогичным образом, эффекторные Т-клетки могут быть исключены из иммуносупрессорной ниши, которая ограничивает способность организма бороться с раком. Более того, как показано в разделе Примеры ниже, Treg, которые экспрессируют GARP-презентируемый TGFβ1, подавляют пролиферацию эффекторных Т-клеток. Вместе с тем, TGFβ1, вероятно, является ключевым фактором в создании и поддержании ингибирующего иммунитет патологического микроокружения (такого как TME), и множественные контексты презентации TGFβ1 актуальны для опухолей. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированная терапия может привести к более благоприятным соотношениям Teff/Treg.

[630] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, как описано в настоящем документе, можно применять в способах лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный способ предусматривает введение антитела или его антигенсвязывающей части субъекту таким образом, что происходит лечение рака. Согласно определенным вариантам осуществления злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль толстой кишки. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой меланому. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой рак головы и шеи. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой рак легких.

[631] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, как описано в настоящем документе, можно применять в способах лечения солидных опухолей. Согласно некоторым вариантам осуществления солидные опухоли могут представлять собой десмопластические опухоли, которые являются, как правило, плотными и жесткими для проникновения терапевтических молекул. В результате целенаправленного воздействия на компонент ECM таких опухолей, такие антитела могут «разрыхлять» плотную опухолевую ткань в целях дезинтеграции, облегчая доступ лекарственных средств с оказанием противоопухолевых эффектов. Таким образом, дополнительные лекарственные средства, такие как любые известные противоопухолевые лекарственные средства, можно использовать в комбинации.

[632] В качестве дополнения или в качестве альтернативы специфические в отношении изоформы контекстно-независимые антитела или их фрагменты, которые способны ингибировать активацию TGFβ1, такие как те, что раскрыты в настоящем документе, можно применять в сочетании с технологией Т-клеток с химерными антигенными рецепторами («CAR-T») в качестве клеточной иммунотерапии, такой как иммунотерапия рака, для борьбы с раком.

[633] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, как описано в настоящем документе, можно применять в способах ингибирования или уменьшения роста солидной опухоли у субъекта, имеющего солидную опухоль, при этом

указанный способ предусматривает введение антитела или его антигенсвязывающей части субъекту таким образом, что рост солидной опухоли ингибируется или уменьшается. Согласно определенным вариантам осуществления солидная опухоль представляет собой карциному толстой кишки. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, пригодные для лечения рака, представляют собой специфический в отношении изоформы контекстно-независимый ингибитор активации TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие антитела нацеливаются на комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и комплекс a LRRC33-TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие антитела нацеливаются на комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1 и комплекс LTBP3-TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие антитела нацеливаются на комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и комплекс LRRC33-TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления такие антитела нацеливаются на комплекс GARP-TGFβ1 и комплекс LRRC33-TGFβ1.

[634] Настоящее изобретение предусматривает применение контекстно-независимых специфических в отношении изоформы ингибиторов TGFβ1 в лечении рака, включающего солидную опухоль, у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления такой контекстно-независимый специфический в отношении изоформы ингибитор может ингибировать активацию TGFβ1. Согласно предпочтительным вариантам осуществления такой ингибитор активации представляет собой антитело или его антигенсвязывающая часть, который связывает комплекс proTGFβ1. Связывание может происходить, когда комплекс связан с любой из презентирующих молекул, например, LTBP1, LTBP3, GARP или LRRC33, тем самым ингибируя высвобождение зрелого фактора роста TGFβ1 из комплекса. Согласно некоторым вариантам осуществления солидная опухоль характеризуется наличием стромы, обогащенной CD8+ Т-клетками, которые непосредственно контактируют с CAF и коллагеновыми волокнами. Такая опухоль может создавать иммуносупрессорную среду, которая препятствует эффективному проникновению противоопухолевых иммунных клеток (например, эффекторных Т-клеток) в опухоль, ограничивая способность организма бороться с раком. Вместо этого такие клетки могут накапливаться в строме опухоли или рядом с ней. Эти особенности могут делать такие опухоли слабо восприимчивыми к терапии ингибиторами иммунных контрольных точек. Как более подробно обсуждается ниже, ингибиторы TGFβ1, раскрываемые в настоящем документе, могут разблокировать супрессию для того, чтобы позволить эффекторным клеткам достичь раковых клеток и уничтожить их, например, при использовании в сочетании с ингибитором иммунных контрольных точек.

[635] Предполагается, что TGFβ1 играет многогранную роль в микроокружении опухоли, включая рост опухоли, подавление иммунитета хозяина, пролиферацию, васкуляризацию, ангиогенез, миграцию, инвазию, метастазирование и устойчивость злокачественных клеток к химиотерапии. Следовательно, каждый «контекст» презентации TGFβ1 в окружении может участвовать в регуляции (или нарушении регуляции) прогрессирования заболевания. Например, ось GARP особенно важна в ответе на Treg, который регулирует ответ эффекторных Т-клеток для опосредования иммунного ответа хозяина для борьбы с раковыми клетками. Ось LTBP1/3 может регулировать ECM, включая строму, где опухуолеассоциированные фибробласты (CAF) играют роль в патогенезе и прогрессировании рака. Ось LRRC33 может играть решающую роль в рекрутинге циркулирующих моноцитов в микроокружение опухоли, последующей дифференцировке в опухолеассоциированные макрофаги (TAM), инфильтрации в ткань опухоли и обострении заболевания.

[636] Согласно некоторым вариантам осуществления клетки, экспрессирующие TGFβ1, инфильтрируют опухоль, создавая иммуносупрессорное локальное окружение или способствуя ей. Степень, в которой наблюдается такая инфильтрация, может коррелировать с более неблагоприятным прогнозом. Согласно некоторым вариантам осуществления более высокая инфильтрация указывает на более слабый терапевтический ответ на другую терапию рака, такую как ингибиторы иммунных контрольных точек. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки, экспрессирующие TGFβ1 в микроокружении опухоли, включают иммуносупрессорные иммунные клетки, такие как Treg и/или миелоидные клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления миелоидные клетки включают без ограничения: макрофаги, моноциты (резидентные или происходящие из костного мозга) и MDSC.

[637] Согласно некоторым вариантам осуществления LRRC33-экспрессирующие клетки в TME представляют собой супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC). Инфильтрация MDSC (например, инфильтрат солидной опухоли) может подчеркивать по меньшей мере один механизм ускользания от иммунологического надзора, создавая иммуносупрессорную нишу, из которой исключаются противоопухолевые иммунные клетки хозяина. Данные свидетельствуют о том, что MDSC мобилизуются сигналами, ассоциированными с воспалением, такими как опухолеассоциированные воспалительные факторы, при мобилизации, MDSC могут влиять на иммуносупрессорные эффекты, повреждая клетки, борющиеся с болезнью, такие как CD8+ Т-клетки и NK-клетки. Кроме того, MDSC могут индуцировать дифференцировку Treg, секретируя TGFβ и IL-10, дополнительно усиливая иммуносупрессорные эффекты. Таким образом, специфический в

отношении изоформы ингибитор TGFβ1, такой как описанные в настоящем документе, можно вводить пациентам с ускользанием от иммунологического надзора (например, с ослабленным иммунологическим надзором) для восстановления или повышения способности организма бороться с заболеванием (например, с опухолью). Как более подробно описано в настоящем документе, это может дополнительно усилить (например, восстановить или потенцировать) восприимчивость или чувствительность организма к другой терапии, такой как терапия рака.

[638] Согласно некоторым вариантам осуществления повышенная частота (например, количество) циркулирующих MDSC у пациентов является прогностическим признаком неблагоприятного ответа на терапию блокадой контрольных точек, такую как антагонисты PD-1 и антагонисты PD-L1. Например, исследования биомаркеров продемонстрировали, что циркулирующие до лечения HLA-DR lo/CD14+/CD11b + миелоидные супрессорные клетки (MDSC) были связаны с прогрессированием и ухудшением общей выживаемости (p = 0,0001 и 0,0009). Кроме того, устойчивость к блокаде контрольной точки PD-1 при воспаленной карциноме головы и шеи (HNC) ассоциируется с экспрессией маркеров GM-CSF и супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC). Это наблюдение позволило предположить, что стратегии истощения MDSC, такие как химиотерапия, следует рассматривать в комбинации или последовательно с антителом к PD-1. Комплексы LRRC33 или LRRC33-TGFβ представляют собой новую мишень для иммунотерапии рака в результате избирательной экспрессии на иммуносупрессивных миелоидных клетках. Следовательно, не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, нацеливание на этот комплекс может повысить эффективность терапии ингибиторами контрольных точек стандартного лечения в популяции пациентов.

[639] Таким образом, настоящее изобретение предусматривает применение высокоаффинного специфического в отношении изоформы ингибитора TGFβ1, описанного в настоящем документе, для лечения рака, который включает солидную опухоль. Такое лечение предусматривает введение ингибитора TGFβ1 субъекту, которому поставлен диагноз рака, который включает по меньшей мере одну локализованную опухоль (солидную опухоль), в количестве, эффективном для лечения рака. Предпочтительно субъект дополнительно получал терапию рака, такую как CBT, химиотерапию и/или лучевую терапию. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ1 повышает частоту/долю популяции пациентов - первично ответивших на терапию рака. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ1 повышает степень реакции первично ответивших на терапию рака. Согласно некоторым вариантам

осуществления ингибитор TGFβ1 повышает соотношение полностью и частично ответивших на терапию рака. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ1 повышает продолжительность эффекта лечения рака, так что продолжительность до рецидива и/или до того, как терапия рака становится неэффективной, повышается. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ1 снижает частоту или вероятность приобретения устойчивости к терапии рака среди первично ответивших на терапию.

[640] Данные свидетельствуют о том, что прогрессирование рака (например, пролиферация/рост, инвазия, ангиогенез и метастазирование опухоли) может по меньшей мере частично быть вызвано взаимодействием опухоли со стромой. В частности, CAF могут способствовать этому процессу путем секреции различных цитокинов и факторов роста и ремоделирования ECM. Факторы, вовлеченные в процесс, включают без ограничения фактор 1, происходящий из стромальных клеток (SCD-1), MMP2, MMP9, MMP3, MMP-13, TNF-α, TGFβ1, VEGF, IL-6, M-CSF. Кроме того, CAF могут рекрутировать TAM, секретируя факторы, такие как CCL2/MCP-1 и SDF-1/CXCL12, в очаг опухоли; впоследствии создается ниша про-TAM (например, стромальные области, обогащенные гиалуронаном), к которой предпочтительно прикрепляются TAM. Поскольку предполагается, что TGFβ1 способствует активации нормальных фибробластов в миофибробластоподобные CAF, введение специфического в отношении изоформы контекстно-независимого ингибитора TGFβ1, такого как описанные в настоящем документе, может быть эффективным для противодействия видм активности CAF, способствующим развитию рака. Действительно, данные, представленные в настоящем документе, предполагают, что специфическое в отношении изоформы контекстно-независимое антитело, которое блокирует активацию TGFβ1, может ингибировать индуцированную UUO повышенную экспрессию генов маркеров, таких как CCL2/MCP-1, α-SMA, FN1 и Col1, которые также вовлечены во многие виды рака.

[641] Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфически связывают комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, как описано в настоящем документе, вводят субъекту, имеющему рак или опухоль, либо в отдельности либо в комбинации с дополнительным средством, например, антителом к PD-1 (например, антагонистом к PD-1). Другие комбинированные виды терапии, которые включены в настоящее изобретение, представляют собой введение антитела или его антигенсвязывающей части, описанного в настоящем документе, совместно с облучением (лучевой терапией) или химиотерапевтическим средством (химиотерапией).

Иллюстративные дополнительные средства включают без ограничения антагонист PD-1, антагонист PDL1, слитый белок PD-L1 или PDL2, антагонист CTLA4, агонист GITR, антитело к ICOS, антитело к ICOSL, антитело к B7H3, антитело к B7H4, антитело к TIM3, антитело к LAG3, антитело к OX40 (агонист OX40), антитело к CD27, антитело к CD70, антитело к CD47, антитело к 41BB, антитело к PD-1, антитело к CD20, ингибитор CDK, онколитический вирус и ингибитор PARP. Примеры пригодных онколитических вирусов включают аденовирус, реовирус, вирус кори, вирус простого герпеса, вирус болезни Ньюкасла, сенекавирус, энтеровирус и вирус осповакцины. Согласно предпочтительным вариантам осуществления онколитический вирус сконструирован для избирательности опухоли.

[642] Согласно некоторым вариантам осуществления определение или выбор терапевтического подхода для комбинированной терапии, который подходит для определенных типов рака или популяции пациентов, может включать следующее: a) факторы касательно типов рака, для которых доступна стандартная терапия (например, одобренные иммунотерапией показания); b) факторы касательно устойчивых к лечению субпопуляций (например, иммунно-исключенные/холодные опухоли); и c) факторы касательно рака/опухолей, которые являются или, как правило, предположительно являются «активными в отношении пути с участием TGFβ1» или иным образом по меньшей мере частично являются TGFβ1-зависимыми (например, чувствительны к ингибированию TGFβ1). Например, многие опухолевые образцы демонстрируют, что TGFβ1 является преобладающей изоформой, например, с помощью анализа RNAseq TCGA. Согласно некоторым вариантам осуществления более 50% (например, более 50%, 60%, 70%, 80% и 90%) образцов от каждого типа опухоли являются положительными в отношении экспрессии изоформы TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления различные виды рака/опухоли, которые являются «активными в отношении пути с участием TGFβ1» или иным образом по меньшей мере частично зависят от TGFβ1 (например, восприимчивы к ингибированию TGFβ1), содержат по меньшей мере одну мутацию Ras, такую как мутации в K-ras, N- ras и/или H-ras. Согласно некоторым вариантам осуществления рак/опухоль содержит по меньшей мере одну мутацию K-ras.

[643] Подтверждение экспрессии TGFβ1 в клинических образцах, собранных у пациентов (таких как биоптаты), не является предварительным условием для терапии на основе ингибирования TGFβ1, когда конкретное состояние, как общеизвестно или предположительно, связано с путем TGFβ.

[644] Согласно некоторым вариантам осуществления специфический в отношении изоформы контекстно-независимый ингибитор TGFβ1 вводят в сочетании с терапией на

основе ингибирования контрольных точек, пациентам, которым поставлен диагноз рака, для которых одобрены или показаны эффективные виды терапии одним или несколькими ингибиторами контрольных точек. Они включают без ограничения: карциному уротелия мочевого пузыря, плоскоклеточную карциному (например, головы и шеи), светлоклеточную карциному почек, папиллярно-клеточную карциному почек, гепатоцеллюлярную карциному печени, аденокарциному легких, меланому кожи и аденокарциному желудка. Согласно предпочтительным вариантам осуществления такие пациенты неэффективно реагируют или не реагируют на терапию ингибиторами контрольных точек. Согласно некоторым вариантам осуществления неэффективная реакция происходит в результате первичной устойчивости. Согласно некоторым вариантам осуществления рак, устойчивый к блокаде контрольных точек, демонстрирует снижение экспрессии TCF7. Согласно некоторым вариантам осуществления снижение экспрессии TCF7 в опухоли, устойчивой к ингибированию контрольных точек, может коррелировать с низким количеством внутриопухолевых CD8+ Т-клеток.

[645] Специфический в отношении изоформы контекстно-независимый ингибитор TGFβ1 можно применять в лечении различных видов рака, устойчивых к химиотерапии или лучевой терапии. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления специфический в отношении изоформы контекстно-независимый ингибитор TGFβ1 вводят пациентам, которым поставлен диагноз рака, по поводу которого они получают или получали химиотерапию и/или лучевую терапию. В частности, применение ингибитора TGFβ1 является предпочтительным, когда рак (пациент) устойчив к такой терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления такой рак включает размножающиеся раковые клетки покоящейся опухоли (TPC), в которых передача сигналов с участием TGFβ контролирует их обратимый переход в состояние задержки роста, что защищает TPC от химиотерапии или лучевой терапии. Предполагается, что при фармакологическом ингибировании TGFβ1, TPC с нарушенной функцией не переходят в состояние покоя и, таким образом, становятся восприимчивыми к химиотерапии и/или лучевой терапии. Такой рак включает различные виды карцином, например, плоскоклеточные карциномы. См., например, Brown et al. (2017) “TGF-β-Induced Quiescence Mediates Chemoresistance of Tumor-Propagating Cells in Squamous Cell Carcinoma.” Cell Stem Cell. 21(5):650-664.

[646] Согласно некоторым вариантам осуществления TGFβ1-положительный рак, подлежащий лечению с помощью ингибитора TGFβ1, также является TGFβ3-положительным (т.е., GFβ1+/TGFβ3+ раком), характеризующийся тем, что пораженная ткань (например, опухоль) коэкспрессирует обе изоформы. Согласно некоторым вариантам осуществления такие опухоли являются кодоминантными как с изоформами TGFβ1, так и

с изоформами TGFβ3. Соответственно, настоящее изобретение предусматривает применение селективного в отношении изоформы ингибитора TGFβ1 в сочетании с селективным в отношении изоформы ингибитором TGFβ3 в лечении таких состояний. Неограничивающие примеры TGFβ1+/TGFβ3+ видов рака включают без ограничения: карциному молочной железы (например, инвазивную карциному молочной железы), холангиокарциному, мультиформную глиобластому, плоскоклеточную карциному головы и шеи, светлоклеточную карциному почек, плоскоклеточную карциному легких, мезотелиому, аденокарциному поджелудочной железы, аденокарциному предстательной железы, саркому, тимому и карциносаркому матки.

Миелопролиферативные нарушения/миелофиброз

[647] Настоящее раскрытие предусматривает терапевтическое применение высокоаффинных селективных в отношении изоформы ингибиторов TGFβ1, таких как раскрываемые в настоящем документе, в лечении миелопролиферативных нарушений. Они включают, например, миелодиспластический синдром (МДС) и миелофиброз (например, первичный миелофиброз и вторичный миелофиброз).

[648] Миелофиброз, также известный как остеомиелофиброз, представляет собой относительно редкое пролиферативное нарушение костного мозга (рак), которое относится к группе заболеваний, называемых миелопролиферативными нарушениями. Миелофиброз относится к отрицательной (-) в отношении филадельфийской хромосомы группе миелопролиферативных новообразований. Миелофиброз характеризуется клональной миелопролиферацией, аберрантным продуцированием цитокинов, экстрамедуллярным гемопоэзом и фиброзом костного мозга. Размножение аномального клона гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге и других участках приводит к фиброзу или замещению костного мозга рубцовой тканью. Термин миелофиброз, если не указано иное, относится к первичному миелофиброзу (PMF). Его также можно назвать хроническим идиопатическим миелофиброзом (cIMF) (термины идиопатический и первичный означают, что в этих случаях заболевание имеет неизвестное или спонтанное происхождение). Это отличается от миелофиброза, который развивается вторично по отношению к истинной полицитемии или эссенциальной тромбоцитемии. Миелофиброз представляет собой форму миелоидной метаплазии, которая относится к изменению типа клеток в кроветворной ткани костного мозга, и часто эти два термина используются как синонимы. Термины агногенная миелоидная метаплазия и миелофиброз с миелоидной метаплазией (МММ) также используются для обозначения первичного миелофиброза. Согласно некоторым вариантам осуществления гематологические пролиферативные нарушения, которые можно лечить

согласно настоящему изобретению, включают миелопролиферативные нарушения, такие как миелофиброз. Так называемая «классическая» группа отрицательных в отношении BCR-ABL (Ph) хронических миелопролиферативных заболеваний включает эссенциальную тромбоцитемию (ET), истинную полицитемию (PV) и первичный миелофиброз (PMF).

[649] Миелофиброз нарушает нормальное продуцирование организмом клеток крови. Результатом является обширное рубцевание костного мозга, ведущее к тяжелой анемии, слабости, утомляемости и часто к увеличению селезенки. Продуцирование цитокинов, таких как фактор роста фибробластов, аномальным клоном гемопоэтических клеток (особенно мегакариоцитами) приводит к замене кроветворной ткани костного мозга соединительной тканью посредством фиброза коллагена. Уменьшение кроветворной ткани снижает способность пациента генерировать новые клетки крови, что приводит к прогрессирующей панцитопении, дефициту всех типов клеток крови. Однако считается, что пролиферация фибробластов и отложение коллагена являются вторичным явлением, и сами фибробласты могут не быть частью аномального клеточного клона.

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

[651] Первичный миелофиброз ассоциирован с мутациями киназы Janus 2 (JAK2), рецептора тромбопоэтина (MPL) и кальретикулина (CALR), что может приводить к конститутивной активации пути с участием JAK-STAT, прогрессирующему рубцеванию или фиброзу костного мозга. У пациентов может развиться экстрамедуллярный гематопоэз, т.е., образование клеток крови, происходящее не в костном мозге, а в других участках, поскольку гемопоэтические клетки вынуждены мигрировать в другие области, в частности, в печень и селезенку. Это вызывает увеличение этих органов. В случае печени аномальный размер называется гепатомегалией. Увеличение селезенки называется спленомегалией, которая также способствует возникновению панцитопении, особенно тромбоцитопении и анемии. Еще одним осложнением экстрамедуллярного кроветворения является пойкилоцитоз или наличие эритроцитов неправильной формы.

[652] Основным очагом экстрамедуллярного кроветворения при миелофиброзе является селезенка, которая, как правило, заметно увеличена у пациентов, страдающих миелофиброзом. В результате массивного увеличения селезенки в селезенке часто возникают множественные субкапсулярные инфаркты, а это означает, что из-за прерывания подачи кислорода к селезенке происходит частичная или полная гибель ткани. На клеточном уровне селезенка содержит предшественники эритроцитов, предшественники

гранулоцитов и мегакариоциты, причем мегакариоциты характеризуются заметным количеством и аномальными формами. Мегакариоциты могут быть причиной вторичного фиброза, наблюдаемого при этом состоянии.

[653] Было высказано предположение, что TGFβ может участвовать в фиброзном аспекте патогенеза миелофиброза (см., например, Agarwal et al., “Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGFβ” (2016) Stem Cell Investig 3:5). Патология костного мозга при первичном миелофиброзе характеризуется фиброзом, неоангеогенезом и остеосклерозом, а фиброз ассоциирован с увеличением продуцирования коллагенов, отложенных в ECM.

[654] Описан ряд биомаркеров, чередование которых указывает на заболевание или коррелирует с ним. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркеры представляют собой клеточные маркеры. Такие биомаркеры, ассоциированные с заболеванием, пригодны для диагностики и/или мониторинга прогрессирования заболевания, а также эффективности терапии (например, восприимчивости пациентов к терапии). Эти биомаркеры включают ряд фиброзных маркеров, а также клеточные маркеры. Например, при раке легких концентрация TGFβ1 в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BAL) значительно выше у пациентов с раком легких по сравнению с пациентами с доброкачественными заболеваниями (увеличение приблизительно в 2 раза), что также может служить биомаркером для диагностики и/или мониторинга прогрессирования или эффектов лечения рака легких.

[655] Поскольку миелофиброз ассоциирован с аномальным развитием мегакариоцитов, определенные клеточные маркеры мегакариоцитов, а также их предшественники линии дифференцировки стволовых клеток могут служить маркерами для диагностики и/или мониторинга прогрессирования заболевания, а также эффективности терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления пригодные маркеры включают без ограничения: клеточные маркеры дифференцированных мегакариоцитов (например, CD41, CD42 и Tpo R), клеточные маркеры клеток-предшественников мегакариоцитов и эритроидных клеток (например, CD34, CD38 и CD45RA-), клеточные маркеры общих миелоидных клеток-предшественников (например, IL-3α/CD127, CD34, SCF R/c-kit и Flt-3/Flk-2) и клеточные маркеры гемопоэтических стволовых клеток (например, CD34, CD38-, Flt-3/Flk-2). Согласно некоторым вариантам осуществления пригодные биомаркеры включают фиброзные маркеры. Они включают без ограничения: TGFβ1/TGFB1, PAI-1 (также известный как серпин 1), MCP-1 (также известный как CCL2), Col1a1, Col3a1, FN1, CTGF, α-SMA, ACTA2, Timp1, Mmp8 и Mmp9. Согласно некоторым вариантам осуществления пригодные биомаркеры представляют

собой маркеры сыворотки крови (например, белки или фрагменты, обнаруженные и обнаруженные в образцах сыворотки крови).

[656] На основании обнаружения того, что TGFβ является компонентом лейкозной ниши костного мозга, предполагается, что нацеливание на микроокружение костного мозга с помощью ингибиторов TGFβ может представлять собой перспективный подход для снижения лейкозных клеток, экспрессирующих молекулы, которые регулируют локальную доступность TGFβ в пораженной ткани.

[657] Действительно, в результате многогранной природы патологии, которая проявляется TGFβ-зависимым нарушением регуляции как в миелопролиферативном, так и в фиброзном аспектах (как предполагает сам термин *«миелофиброз»*), специфические в отношении изоформы контекстно-независимые ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, может обеспечить особенно благоприятные терапевтические эффекты для пациентов, страдающих миелофиброзом. Предполагается, что область LTBP такого ингибитора может нацеливаться на ECM-ассоциированный комплекс TGFβ1 в костном мозге, в то время как плечо LRRC33 ингибитора может блокировать TGFβ1, ассоциированный с миелоидными клетками. Кроме того, аномальная биологическая функция мегакариоцитов, ассоциированных с миелофиброзом, может включать как GARP-, так и LTBP-опосредованную активность TGFβ1. Специфический в отношении изоформы контекстно-независимый ингибитор TGFβ1 способен нацеливаться на такие комплексы, тем самым подавляя высвобождение активного TGFβ1 в нише.

[658] Таким образом, такие ингибиторы TGFβ1 пригодны для лечения пациентов с первичным и вторичным миелофиброзом, у которых наблюдался недостаточный ответ на другие (или стандартные) виды лечения, такие как гидроксимочевина и ингибиторы JAK, или они не переносят их. Такие ингибиторы также применимы для лечения пациентов с миелофиброзом (MF) среднего или высокого риска, включая первичный MF, MF после истинной полицитемии и MF после эссенциальной тромбоцитемии.

[659] Соответственно, один аспект настоящего изобретения относится к способам лечения первичного миелофиброза. Способ предусматривает введение пациенту, страдающему первичным миелофиброзом, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей ингибитор TGFβ, который вызывает снижение доступности TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления пациентам с миелофиброзом вводят специфическое в отношении изоформы контекстно-независимое моноклональное антитело, ингибитор активации TGFβ1. Такое антитело можно вводить в дозах от 0,1 до 100 мг/кг, например, от 1 до 30 мг, например, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг, 20 мг/кг, 30 мг/кг и т.д. Например, подходящие режимы дозирования включают 1-30 мг/кг, вводимые

еженедельно. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ1 вводят в дозе приблизительно 10 мг/кг в неделю. Необязательно частота введения может быть скорректирована после начальной фазы, например, от приблизительно одного раза в неделю (во время начальной фазы) до одного раза в месяц (во время поддерживающей фазы).

[660] Предпочтительными способами введения фармацевтической композиции, содержащей антитело, являются внутривенное или подкожное введение. Когда композицию вводят внутривенно, пациенту может быть введено терапевтическое средство в течение подходящего периода времени, например, приблизительно 30-120 минут (например, 30 минут, 60 минут, 75 минут, 90 минут и 120 минут) на курс лечения, а затем повторяться каждые несколько недель, например, 3 недели, 4 недели, 6 недель и т.д., в общей сложности в течение нескольких циклов, например, 4 циклов, 6 циклов, 8 циклов, 10 циклов, 12 циклов и т.д. Согласно некоторым вариантам осуществления пациентов лечат композицией, содержащей ингибирующее антитело при уровне дозы 1-10 мг/кг (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг на дозирование) посредством внутривенного введения каждые 28 дней (4 недели) в течение 6 или 12 циклов. Согласно некоторым вариантам осуществления такое лечение вводят в виде хронической (долгосрочной) терапии (например, чтобы продолжать бесконечно, пока считается эффективным) вместо прекращения после установленного количества циклов введения.

[661] Хотя миелофиброз считается разновидностью лейкемии, он также характеризуется проявлением фиброза. Поскольку известно, что TGFβ регулирует аспекты гомеостаза ECM, нарушение регуляции которого может приводить к фиброзу ткани, желательно ингибировать различные виды активности TGFβ, ассоциированные с ECM. Соответственно, антитела или их фрагменты, которые связывают и ингибируют proTGFβ, презентируемые LTBP (такими как LTBP1 и LTBP3), охватываются настоящим изобретением. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их фрагменты, подходящие для лечения миелофиброза, являются «контекстно-независимыми» в том смысле, что они могут связывать несколько контекстов комплекса proTGFβ, таких как те, которые ассоциированы с LRRC33, GARP, LTBP1, LTBP3 или любой их комбинацией. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело представляет собой контекстно-независимый ингибитор активации TGFβ, отличающийся тем, что антитело может связывать и ингибировать любой из следующих латентных комплексов: LTBP1-proTGFβ, LTBP3-proTGFβ, GARP-proTGFβ и LRRC33-proTGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело представляет собой специфическое в отношении изоформы антитело, которое связывает и ингибирует такие латентные комплексы, которые

содержат одну, но не другие изоформы TGFβ. Они включают, например, LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления такое антитело представляет собой селективное в отношении изоформы антитело, которое предпочтительно связывается с высокой аффинностью и ингибирует передачу сигналов с участием TGFβ1.

[662] Ранние данные in vivo указывают на то, что селективный в отношении изоформы контекстно-независимый ингибитор TGFβ1, такой, как описанный в настоящем документе, можно применять для лечения миелофиброза в трансформируемой мышиной модели первичного миелофиброза. В отличие от действующего стандарта лечения ингибитором JAK2, который обеспечивает только облегчение симптомов, но не дает клинических преимуществ или преимуществ в отношении выживаемости, селективный в отношении изоформы контекстно-независимый ингибитор TGFβ1 обеспечивает значительные антифиброзные эффекты в костном мозге больных мышей, а также может продлить выживаемость, подтверждая представление о том, что ингибитор TGFβ1 может быть эффективным для лечения миелопролиферативных нарушений у пациентов-людей.

[663] Подходящие популяции пациентов с миелопролиферативными новообразованиями, которых можно лечить с помощью композиций и способов, описанных в настоящем документе, могут включать без ограничения: a) популяцию пациентов, которая является положительной (+) в отношении филадельфийской хромосомы; b) популяцию пациентов, которая является отрицательной (-) в отношении филадельфийской хромосомы; c) популяцию пациентов, которая относится к категории «классической» (PV, ET и PMF); d) популяцию пациентов, несущих мутацию JAK2V617F(+); e) популяцию пациентов, несущих JAK2V617F(-); f) популяцию пациентов с экзоном 12(+) JAK2; g) популяцию пациентов с MPL(+); и h) популяцию пациентов с CALR(+).

[664] Согласно некоторым вариантам осуществления популяция пациентов включает пациентов с промежуточным 2 типом или высоким риском миелофиброза. Согласно некоторым вариантам осуществления популяция пациентов включает субъектов с миелофиброзом, которые не поддаются доступной терапии или не являются кандидатами для нее. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет количество тромбоцитов 100-200 $\times$ 10^9/л. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект до лечения имеет количество тромбоцитов > 200 $\times$ 10^9/л.

[665] Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту, получающему (и который может испытывать эффект от получения) терапию специфическим в отношении изоформы контекстно-независимым ингибитором TGFβ1, поставлен диагноз первичного миелофиброза промежуточного 1 типа или выше (PMF) или истинной

постполицитемии/миелофиброза на основе эссенциальной тромбоцитемии (пост-PV/ET MF). Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта документально подтвержден фиброз костного мозга до лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления до лечения субъект имеет MF-2 или выше по оценке по Европейской консенсусной шкале оценок и уровень 3 или выше по модифицированной шкале Бауэрмейстера. Согласно некоторым вариантам осуществления до лечения субъект имеет статус эффективности ECOG 1. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта до лечения количество лейкоцитов (10^9/л) находится в диапазоне от 5 до 120. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет аллельную нагрузку *JAK2V617F*, которая находится в диапазоне 10-100%.

[666] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, получающий (и который может испытывать эффект от получения) специфическую в отношении изоформы контекстно-независимую терапию ингибитором TGFβ1, зависит от трансфузии (до лечения), характеризующейся тем, что субъект имеет в анамнезе не менее двух единиц переливаний эритроцитов за последний месяц при уровне гемоглобина менее 8,5 г/дл, который не ассоциирован с клинически явным кровотечением.

[667] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, получающий (и который может испытывать эффект от получения) специфическую в отношении изоформы контекстно-независимую терапию ингибитором TGFβ1, ранее получал терапию для лечения миелофиброза. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекта лечили одним или несколькими видами терапии, включая без ограничения: AZD1480, панобиностат, EPO, IFNα, гидроксимочевину, пегилированный интерферон, талидомид, преднизон и ингибитор JAK2 (например, лестауртиниб, CEP-701).

[668] Согласно некоторым вариантам осуществления пациент имеет экстрамедуллярный гемопоэз. Согласно некоторым вариантам осуществления экстрамедуллярный гемопоэз происходит в печени, легком, селезенке и/или лимфатических узлах. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят локально в одно или несколько локализованных очагов проявления заболевания.

[669] Специфический в отношении изоформы контекстно-независимый ингибитор TGFβ1 вводят пациентам в количестве, эффективном для лечения миелофиброза. Терапевтически эффективное количество представляет собой количество, достаточное для облегчения одного или нескольких симптомов и/или осложнений миелофиброза у пациентов, включая без ограничения: чрезмерное отложение ECM в строме костного мозга (фиброз костного мозга), неоангиогенез, остеосклероз, спленомегалию, гематомегалию,

анемию, кровотечение, боль в костях и другие заболевания, связанные с костями, экстрамедуллярный гемопоэз, тромбоцитоз, лейкопению, кахексию, инфекции, тромбоз и смерть. Таким образом, виды терапии на основе ингибирования TGFβ1, включающие антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему раскрытию, могут достигать клинических преимуществ, которые включают, помимо прочего, антифиброзные эффекты и/или нормализацию количества клеток крови. Такая терапия может продлить выживаемость и/или снизить потребность в трансплантации костного мозга.

[670] Согласно некоторым вариантам осуществления количество является эффективным для снижения экспрессии и/или секреции TGFβ1 (например, мегакариоцитарных клеток) у пациентов. Таким образом, такой ингибитор может снижать уровни мРНК TGFβ1 у пациентов, получивших лечение. Согласно некоторым вариантам осуществления такой ингибитор снижает уровни мРНК TGFβ1 в костном мозге, например, в мононуклеарных клетках. Пациенты с PMF, как правило, демонстрируют повышенные уровни TGFβ1 в плазме выше ~ 2500 пг/мл, например, выше 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 и 10000 пг/мл (в отличие от нормальных диапазонов ~ 600-2000 пг/мл, как измеряют с помощью ELISA) (см., например, Mascaremhas et al. (Leukemia & Lymphoma, 2014, 55(2): 450-452)). Zingariello (Blood, 2013, 121(17): 3345-3363) количественно определял биоактивное и общее содержание TGFβ1 в плазме крови пациентов с PMF и контрольных индивидуумов. В соответствии с этой ссылкой, медианное содержание биоактивного TGFβ1 у пациентов с PMF составляло 43 нг/мл (в диапазоне от 4 до 218 нг/мл), а общее содержание TGFβ1 составляло 153 нг/мл (32-1000 нг/мл), в то время как у контрольных аналогов значения составляли 18 (0,05-144) и 52 (8-860) соответственно. Таким образом, на основании этих отчетов содержание TGFβ1 в плазме крови у пациентов с PMF повышается в несколько раз, например, в 2, 3, 4, 5 раз и т.д., по сравнению с контрольными или нормальными образцами плазмы крови. Лечение ингибитором, например, после 4-12 циклов введения (например, 2, 4, 6, 8, 10, 12 циклов) или хроническое или долгосрочное лечение, например, каждые 4 недели, в дозировке 0,1-100 мг/кг, например, 1-30 мг/кг моноклонального антитела), описанное в настоящем документе, может снизить уровни TGFβ1 в плазме крови по меньшей мере на 10% относительно соответствующего исходного уровня (до лечения), например, по меньшей мере на 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% и 50%.

[671] Некоторые терапевтические эффекты могут наблюдаться относительно быстро после начала лечения, например, через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель или 6 недель. Например, ингибитор может эффективно повышать количество стволовых клеток и/или клеток-предшественников в костном мозге пациентов, получавших

ингибитор, в течение 1-8 недель. Они включают гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники крови. Биопсия костного мозга может быть выполнена для оценки изменений частоты/количества клеток костного мозга. Соответственно, пациент может демонстрировать нормализацию таких симптомов, как боль в костях и усталость.

[672] Субъекты, страдающие миелопролиферативным нарушением (например, миелофиброзом), могут иметь повышенный уровень лейкоцитов (например, лейкозных). Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтически эффективное количество ингибитора TGFβ1 представляет собой количество, которое эффективно для нормализации количества клеток крови. Согласно некоторым вариантам осуществления количество эффективно для снижения общего количества лейкоцитов у субъекта по сравнению с предварительным лечением. Согласно некоторым вариантам осуществления количество эффективно для снижения общего количества тромбоцитов у субъекта по сравнению с предварительным лечением. Согласно некоторым вариантам осуществления количество является эффективным для повышения (например, нормализации или восстановления) уровней гемоглобина у субъекта по сравнению с предварительным лечением. Согласно некоторым вариантам осуществления количество является эффективным для повышения (например, нормализации или восстановления) уровней гематокрита у субъекта по сравнению с предварительным лечением.

[673] Одним из морфологических признаков миелофиброза является фиброз в костном мозге (например, строме костного мозга), который частично характеризуется аберрантным ECM. Согласно некоторым вариантам осуществления количество является эффективным для уменьшения фиброза, характеризующегося избыточным отложением коллагена, например, мезенхимальными стромальными клетками. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор является эффективным для уменьшения количества CD41-положительных клеток, например мегакариоцитов, у субъектов, получавших лечение, по сравнению с контрольными субъектами, которые не получают лечение. Согласно некоторым вариантам осуществления исходные частоты мегакариоцитов в костном мозге PMF могут находиться в диапазоне от 200 до 700 клеток на квадратный миллиметр ($мм^2$) и от 40 до 300 мегакариоцитов на квадратный миллиметр ($мм^2$) в селезенке PMF, как определено с помощью случайно выбранных срезов. В отличие от этого, частота мегакариоцитов в костном мозге и селезенке нормальных доноров составляет менее 140 и менее 10 соответственно. Лечение ингибитором может снизить количество (например, частоту) мегакариоцитов в костном мозге и/или селезенке. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение ингибитором может вызывать снижение уровней последующей эффекторной передачи сигналов, такой как фосфорилирование SMAD2/3. Согласно

некоторым вариантам осуществления ингибитор является эффективным для снижения уровней экспрессии фиброзных маркеров, таких как описанные в настоящем документе.

[674] Пациенты с миелофиброзом могут страдать от увеличения селезенки. Таким образом, клинические эффекты терапевтического средства можно оценить, отслеживая изменения размера селезенки. Размер селезенки может быть исследован с помощью известных методик, таких как оценка длины селезенки путем пальпации и/или оценка объема селезенки с помощью ультразвука. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, который получает лечение специфическим в отношении изоформы контекстно-независимым ингибитором TGFβ1, имеет исходную длину селезенки (до лечения) 5 см или более, например, в диапазоне от 5 до 30 см, как оценено путем пальпации. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, который получает лечение специфическим в отношении изоформы контекстно-независимым ингибитором TGFβ1, имеет исходный объем селезенки (до лечения) 300 мл или более, например, в диапазоне от 300 до 1500 мл, как оценено с помощью ультразвука. Лечение ингибитором, например, после 4-12 циклов введения (например, 2, 4, 6, 8, 10, 12 циклов), например, каждые 4 недели, в дозировке 0,1-30 мг/кг моноклонального антитела), описанное в настоящем документе, может уменьшить размер селезенки у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество ингибитора является достаточным для уменьшения размера селезенки в популяции пациентов, которые получают лечение ингибитором, на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 50% и 60% по отношению к соответствующим значениям исходного уровня. Например, лечение является эффективным для достижения уменьшения объема селезенки на ≥35% от исходного уровня за 12-24 недели, как измерено с помощью визуализации MRI или CT, по сравнению с контролем плацебо. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение является эффективным для достижения уменьшения объема селезенки на ≥35% от исходного уровня за 24-48 недель, как измерено с помощью визуализации MRI или CT, по сравнению с контролем наиболее эффективной доступной терапией. Наиболее эффективная доступная терапия может включать гидроксимочевину, глюкокортикоиды, а также отсутствие лекарственных средств, анагрелид, эпоэтин альфа, талидомид, леналидомид, меркаптопурин, тиогуанин, даназол, пегинтерферон альфа-2a, интерферон-α, мелфалан, ацетилсалициловую кислоту, цитарабин и колхицин.

[675] Согласно некоторым вариантам осуществления популяция пациентов, получающих лечение специфическим в отношении изоформы контекстно-независимым ингибитором TGFβ1, таким как описанные в настоящем документе, демонстрирует статистически улучшенный ответ на лечение по оценке, например, с помощью критериев Международной рабочей группой по исследованию и лечению миелофиброза (IWG-MRT),

степени изменения степени фиброза костного мозга, измеряемой по модифицированной шкале Бауэрмейстера и европейской консенсусной системе оценок после лечения (например, 4, 6, 8 или 12 циклов), реакции симптомов с использованием Формы оценки симптомов миелопролиферативного новообразования (MPN-SAF).

[676] Согласно некоторым вариантам осуществления лечение специфическим в отношении изоформы контекстно-независимым ингибитором TGFβ1, таким как описанные в настоящем документе, обеспечивает статистически улучшенный ответ на лечение, как оценивается, например, с помощью модифицированной Формы оценки симптомов миелофиброза (MFSAF), в которой измеряются симптомы с помощью инструмента MFSAF (например, v2.0), дневника, фиксирующего ослабляющие симптомы миелофиброза (дискомфорт в животе, раннее насыщение, боль под ребрами слева, зуд, ночная потливость и боль в костях/мышцах) по шкале от 0 до 10, где 0 означает отсутствие, а 10 означает худшее из возможного. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение является эффективным для достижения 50% ≥ снижения общего показателя MFSAF от исходного уровня, например, через 12-24 недели. Согласно некоторым вариантам осуществления значительная часть пациентов, получающих терапию, достигает ≥50% улучшения общей оценки симптомов по сравнению с пациентами, принимающими плацебо. Например, доля пациентов, достигших улучшения ≥50%, может составлять более 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80%.

[677] Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтически эффективное количество ингибитора представляет собой количество, достаточное для достижения клинического улучшения, как оценивается по ответу на анемию. Например, улучшенный ответ на анемию может включать более длительные периоды независимости от переливания крови, например, 8 недель или дольше, после лечения 4-12 циклов, например 6 циклов.

[678] Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтически эффективное количество ингибитора представляет собой количество, достаточное для поддержания стабильного заболевания в течение определенного периода времени, например, 6 недель, 8 недель, 12 недель, шесть месяцев и т.д. Согласно некоторым вариантам осуществления прогрессирование заболевания может оцениваться по изменениям общей целлюлярности костного мозга, степени ретикулинового или коллагенового фиброза и/или по изменению аллельной нагрузки *JAK2V617F*.

[679] Согласно некоторым вариантам осуществления популяция пациентов, получающих лечение специфическим в отношении изоформы контекстно-независимым ингибитором TGFβ1, таким как описанные в настоящем документе, демонстрирует

статистически улучшенную (пролонгированную) выживаемость по сравнению с контрольной популяцией, которая не получает лечение. Например, в контрольных группах средняя выживаемость пациентов с PMF составляет приблизительно шесть лет (приблизительно 16 месяцев у пациентов с высоким риском), и ожидается, что менее 20% пациентов проживут 10 или более лет после постановки диагноза. Лечение специфическим в отношении изоформы контекстно-независимым ингибитором TGFβ1, такими как описанные в настоящем документе, может продлить время выживания, на по меньшей мере, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев, 36 месяцев или 48 месяцев. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение является эффективным для достижения улучшенной общей выживаемости через 26 недель, 52 недели, 78 недель, 104 недели, 130 недель, 144 недели или 156 недель по сравнению с пациентами, которые получают плацебо.

[680] Клинические преимущества терапии, такие как представленные в качестве примеров выше, можно увидеть у пациентов с впервые возникшей анемией или без нее.

[681] Одной из предпочтительных особенностей специфических в отношении изоформы контекстно-независимых ингибиторов TGFβ1 является то, что они поддерживают улучшенные профили безопасности, обеспечиваемые селективностью изоформ, по сравнению с традиционными антагонистами TGFβ, которые не обладают селективностью. Следовательно, ожидается, что лечение специфическим в отношении изоформы контекстно-независимым ингибитором, таким как описанные в настоящем документе, может уменьшить нежелательные явления в популяции пациентов по сравнению с эквивалентными популяциями пациентов, получавших традиционные антагонисты TGFβ, в отношении частоты и/или тяжести таких явлений. Таким образом, специфические в отношении изоформы контекстно-независимые ингибиторы TGFβ1 могут обеспечить большее терапевтическое окно в отношении дозировки и/или продолжительности лечения.

[682] Нежелательные явления могут быть оценены с помощью признанных в настоящей области техники подходящих способов, таких как Общие терминологические критерии нежелательных явлений (CTCAE) версии 4. Ранее сообщаемые нежелательные явления у пациентов-людей, получавших антагонисты TGFβ, такие как GC1008, включают в себя: лейкоцитоз (3-й степени), утомляемость (3-й степени), гипоксию (3-й степени), асистолию (5-й степени), лейкопению (1-й степени), рецидивирующие, преходящие, болезненные эритематозные узелковые поражения кожи, гнойный дерматит и опоясывающий лишай.

[683] Терапия специфическим в отношении изоформы контекстно-независимым ингибитором TGFβ1 может вызывать менее частые и/или менее серьезные нежелательные явления (побочные эффекты) по сравнению с терапией ингибитором JAK у пациентов с миелофиброзом, например, в отношении анемии, тромбоцитопении, нейтропении, гиперхолестеринемии, повышенного уровня аланинтрансаминазы (ALT), повышенноного уровня аспартаттрансаминазы (AST), кровоподтеков, головокружения и головной боли, что обеспечивает более безопасный вариант лечения.

[684] Предполагается, что ингибиторы передачи сигналов с участием TGFβ1 можно использовать в сочетании с одним или несколькими терапевтическими средствами для лечения миелофиброза в качестве комбинированной (например, «дополнительной») терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор активации TGFβ1, описанный в настоящем документе, вводят пациентам, страдающим миелофиброзом, которые получали ингибитор JAK1, ингибитор JAK2 или ингибитор JAK1/JAK2 или являются кандидатами на их получение. Согласно некоторым вариантам осуществления такие пациенты восприимчивы к терапии ингибитором JAK1, ингибитором JAK2 или ингибитором JAK1/JAK2, тогда как в соответствии с другими вариантами осуществления такие пациенты неэффективно реагируют или не реагируют на терапию ингибитором JAK1, ингибитором JAK2 или ингибитором JAK1/JAK2. Согласно некоторым вариантам осуществления применение специфического в отношении изоформы ингибитора TGFβ1, описанного в настоящем документе, может сделать более восприимчивыми тех, кто неэффективно реагирует или не реагирует на терапию ингибитором JAK1, ингибитором JAK2 или ингибитором JAK1/JAK2. Согласно некоторым вариантам осуществления применение специфического в отношении изоформы ингибитора TGFβ1, описанного в настоящем документе, может позволить снизить дозировку ингибитора JAK1, ингибитора JAK2 или ингибитора JAK1/JAK2, который по-прежнему обеспечивает эквивалентную или значимую клиническую эффективность или преимущества у пациентов, но с меньшей токсичностью или меньшей ее степенью или меньшими нежелательными явлениями, связанными с лекарственными средствами (например, перечисленные выше). Согласно некоторым вариантам осуществления лечение ингибитором активации TGFβ1, описанным в настоящем документе, используемым в сочетании с терапией ингибитором JAK1, ингибитором JAK2 или ингибитором JAK1/JAK2, может вызывать синергетический или аддитивный терапевтический эффект у пациентов. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение ингибитором активации TGFβ1, описанным в настоящем документе, может усиливать эффекты ингибитора JAK1, ингибитора JAK2 или ингибитора JAK1/JAK2 или другой терапии, применяемой для лечения миелофиброза. Согласно

некоторым вариантам осуществления пациенты могут дополнительно получать терапевтическое средство для лечения анемии, ассоциированной с миелофиброзом.

Фиброзные состояния

[685] В ответ на повреждение ткани в результате физического повреждения/травмы, токсичных веществ и/или инфекции начинается естественный репаративный процесс, который включает несколько типов клеток, включая фибробласты, несколько различных типов иммунных клеток и резидентные эпителиальные и эндотелиальные клетки. Однако, при отсутствии контроля, этот процесс может привести к чрезмерному накоплению внеклеточного матрикса (ECM) и фиброзу, что, в свою очередь, может привести к прогрессирующей потере функции ткани и органной недостаточности (Caja et al., *Int. J. Mol. Sci*. 2018, 19, 1294).

[686] Фиброз может возникать в ряде органов, включая легкие, почки, печень, сердце и кожу. Независимо от органа, фиброзный ответ характеризуется воспалением, измененными эпителиально-мезенхимальными взаимодействиями и пролиферацией фибробластов. Одним из отличительных признаков фиброза является дифференцировка фибробластов в миофибробласты, которые в значительной степени способствуют нарушению регуляции ECM. Однако предполагалось, что миофибробласты происходят из других клеточных источников (например, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки и мезенхимальные стволовые клетки (Kim, K.K. et al, Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 2017; Okabe, H. Histol. Histophathol., 2016, 31, 141-148; и Li, C et al, Nat Commun., 2016, 7, 11455). Более того, иммунные клетки играют важную роль в этом процессе, секретируя цитокины и хемокины, которые способствуют дифференцировке миофибробластов, стимулируют отложение ECM и привлекают дополнительные иммунные клетки в поврежденную ткань (Caja et al., *Int. J. Mol. Sci*. 2018, 19, 1294).

[687] Подобно фиброзной ткани, активация ассоциированных с раком фибробластов может происходить в опухолевой среде, которая производит чрезмерное количество ECM. ECM обеспечивает каркас для инфильтрации других клеток (например, проканкогенных иммунных клеток) и субстрат для миграции клеток. В других случаях чрезмерный ECM может действовать как барьер против противоопухолевых иммунных клеток.

[688] TGFβ считается центральным организатором фиброзного ответа. TGFβ может способствовать дифференцировке миофибробластов, рекрутировать иммунные клетки и влиять на дифференцировку эпителиальных и эндотелиальных клеток. В частности, TGFβ активирует продуцирование белков внеклеточного матрикса и базальной мембраны, таких

как фибронектин, коллаген, ламинин, остеопонтин, тенасцин, эластин, декорин. TGFβ-индуцированная дифференцировка миофибробластов может приводить к дополнительному отложению белков ECM, секреции матричных металлопротеиназ (MMP) и пролиферации миофибробластов (Fabregat et al, *FEBS J.* 2016, 283, 2219-2232; Meng et al, *Nat. Rev. Nephrol.* 2016, 12, 325-338; и Kulkarni et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2016, 54, 751-760). Кроме того, TGFβ опосредует фенотипические изменения, влияющие на сократительные белки и коллаген I типа в гладкомышечных клетках сосудов (VSCM), и может активировать миофибробласты и другие стромальные клетки для усиления синтеза сшивающих коллаген белков, таких как семейство лизилоксидаз (LOX) матриксных ремоделирующих ферментов (Busnadiego et al., *Mol.*Cell. *Cell. Biol.* 2013, 33, 2388-2401). Более того, было продемонстрировано, что TGFβ регулирует как EMT, так и EndMT, что способствует дифференцировке профиброзных типов клеток, таких как миофибробласты и CAF. Более того, было продемонстрировано, что TGFβ вызывает апоптоз эпителия, который может способствовать фиброзу легких и печени в других тканях (Barbas-Filho et al., *J. Clin. Pathol.* 2001, 54, 132-138; и Wang et al., *Dev. Dyn.* 2017, 247, 492-508).

[689] Врожденные или рекрутированные макрофаги играют важную роль в ответе на повреждение и репарацию тканей. Однако при определенных сигналах они могут стать профиброзными. Также было продемонстрировано, что TGFβ, среди других цитокинов, активирует макрофаги M2, которые являются провоспалительными. После активации эти макрофаги секретируют свои собственные цитокины, включая TGFβ, компоненты ECM, ангиогенные факторы и хемотаксические факторы. Было продемонстрировано, что макрофаги M2 необходимы для фиброза легких, обусловленного TGFβ (Murray et al., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2011, 43, 154-162).

[690] Таким образом, согласно настоящему изобретению, специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, используются для лечения фиброза (например, фиброзных признаков, фиброзных состояний) у субъекта. Подходящие ингибиторы для осуществления настоящего изобретения включают антитела и/или композиции в соответствии с настоящим раскрытием, которые могут быть пригодны для изменения или нормализации фиброза. Более конкретно, такие антитела и/или композиции являются селективными антагонистами TGFβ1, которые способны нацеливаться на TGFβ1, презентируемый различными типами презентирующих молекул.

[691] Антитела, нацеленные на TGFβ, уменьшают фиброз в многочисленных доклинических моделях. Такие антитела и/или соединения на основе антител включают LY2382770 (Eli Lilly, Индианаполис, Индиана). Также включены таковые, описанные в

патентах США №№ US 6492497, US 7151169, US 7723486 и публикации заявки на патент США № 2011/0008364, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Антагонисты TGFβ, известные из уровня техники, включают, например, средства, которые нацелены и блокируют интегрин-зависимую активацию TGFβ.

[692] Однако данные свидетельствуют о том, что такие средства предшествующего уровня техники не могут опосредовать специфическое в отношении изоформы ингибирование и могут вызывать нежелательные эффекты путем непреднамеренного блокирования нормальной функции TGFβ2 и/или TGFβ3. Действительно, заявитель ранее отмечал, что нормальные (не патологические) ткани легких содержат относительно низкие, но измеримые уровни TGFβ2 и TGFβ3, но заметно меньше TGFβ1. Для сравнения, при определенных патологических состояниях, таких как фиброз, экспрессия TGFβ1 становится предпочтительно повышенной по сравнению с другими изоформами (WO 2018/129329). Предпочтительно антагонисты TGFβ для применения при лечении таких состояний проявляют свою ингибирующую активность только в отношении изоформы, вызванной или ассоциированной с заболеванием, при сохранении функции других изоформ, которые, как правило, экспрессируются, чтобы опосредовать передачу тонических сигналов в ткани. Продемонстрировано, что ингибиторы предшествующего уровня техники (LY2109761, низкомолекулярный антагонист рецептора TGFβ и моноклональное антитело, нацеленное на интегрин αVβ6) ингибируют последующую тоническую передачу сигналов с участием TGFβ в BAL крыс без заболевания, что повышает вероятность того, что эти ингибиторы могут вызывать нежелательные побочные эффекты. В качестве альтернативы или в качестве дополнения, средства, которые нацелены и блокируют интегрин-зависимую активацию TGFβ, могут быть способны блокировать только подгруппу интегринов, ответственных за активацию TGFβ1, ассоциированную с заболеванием, среди множества типов интегринов, которые экспрессируются различными типами клеток и играют роль в патогенезе. Более того, даже если такие антагонисты могут избирательно блокировать опосредованную интегрином активацию изоформы TGFβ1, они могут быть неэффективными при блокировании активации TGFβ1, активируемой другими способами, такими как протеазозависимая активация. В отличие от этого, специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, нацелены на предупреждение стадии активации TGFβ1 независимо от конкретного режима активации, при сохранении селективности изоформ.

[693] Кроме того, предполагается, что ингибиторы TGFβ3, специфические в отношении изоформ, могут иметь терапевтический эффект при определенных

патологических состояниях. Например, определенные фиброзные заболевания, которые подлежат лечению ингибитором TGFβ1, также могут быть TGFβ3-положительными (т.е., TGFβ1+/TGFβ3+ фиброзная ткань), характеризующаяся тем, что патологическая ткань (например, фиброзная ткань) экспрессирует обе изоформы. Соответственно, настоящее изобретение предусматривает применение селективного в отношении изоформы ингибитора TGFβ1 в сочетании с селективным в отношении изоформы ингибитором TGFβ3 в лечении таких состояний. Такие ингибиторы TGFβ3 могут быть контекстно-независимыми или контекстно-зависимыми.

[694] Показания для лечения фиброза, при которых антитела и/или композиции по настоящему изобретению могут быть использованы терапевтически, включают в себя, помимо прочего, показания для легких (например, идиопатический фиброз легких (IPF), хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), аллергическую астму, острое повреждение легких, эозинофильный эзофагит, легочную артериальную гипертензию и поражение газообразными отравляющими веществами), показания для лечения почек (например, диабетический гломерулосклероз, фокальный сегментарный гломерулоклероз (FSGS), хроническую болезнь почек (CKD), фиброз, ассоциированный с трансплантацией и хроническим отторжением почки, IgA-нефропатию и гемолитический уремический синдром), фиброз печени (например, ассоциированный с неалкогольным стеатогепатитом (NASH) или вызванный им, хронический вирусный гепатит, паразитемию, врожденные нарушения обмена веществ, опосредованный токсинами фиброз, такой как алкогольный фиброз, неалкогольный стеатогепатит-гепатоцеллюлярную карциному (NASH-HCC), первичный билиарный цирроз и склерозирующий холангит), сердечно-сосудистый фиброз (например, кардиомиопатию, гипертрофическую кардиомиопатию, атеросклероз и рестеноз), системный склероз, фиброз кожи (например, фиброз кожи при системном склерозе, диффузный кожный системный склероз, склеродермию, патологическое рубцевание кожи, келоид, послеоперационное рубцевание, операцию по коррекции рубца, радиационно-индуцированное рубцевание и хронические раны), патологические состояния глаз, такие как субретинальный фиброз, синдром увеита, увеит, ассоциированный с идиопатическим ретроперитонеальным фиброзом, фиброз экстраокулярных мышц, заболевания глаз, ассоциированные с главным комплексом гистосовместимости (MHC I класса) или антигенами гистосовместимости, субретинальный фиброз при дегенерации желтого пятна (например, возрастную дегенерацию желтого пятна) и рак или вторичный фиброз (например, миелофиброз, рак головы и шеи, острый мегакариобластный лейкоз M7 и мукозит). Другие заболевания, нарушения и состояния, связанные с фиброзом (включая дегенеративные нарушения), которые можно лечить с помощью соединений и/или

композиций по настоящему раскрытию, включают без ограничения аденомиоз, эндометриоз, синдром Марфана, синдром жесткой кожи, склеродермию, ревматоидный артрит, фиброз костного мозга, болезнь Крона, язвенный колит, системную красную волчанку, мышечную дистрофию (такую как DMD), болезнь Паркинсона, ALS, контрактуру Дюпюитрена, синдром Камурати-Энгельманна, рубцевание нервной ткани, деменцию, пролиферативную витреоретинопатию, повреждение роговицы, осложнения после операции по установлению дренажа при глаукоме и рассеянный склероз (MS).

[695] Многие показания для лечения фиброза также ассоциированы с воспалением пораженной (пораженных) ткани (тканей), включающим участие иммунного компонента. Такое воспаление может сопровождаться аберрантными популяциями иммунных клеток, такими как повышенное количество клеток Th17, пониженное количество клеток Treg и/или и то, и другое. В каждом случае у пораженного пациента могут наблюдаться повышенные соотношения Th17/Treg клеток. Виды активностей селективных в отношении изоформы антител в отношении нацеливания на GARP и/или LRRC33 может оказывать ингибирующее действие на эти контексты.

[696] Согласно некоторым вариантам осуществления фиброзные показания, которые можно лечить с помощью композиций и/или способов, описанных в настоящем документе, включают фиброз органов, такой как фиброз легких (например, IPF), фиброз почек (например, фиброз, ассоциированный с CKD), фиброз печени (например, ассоциированный с NASH или в результате его), фиброз сердца или сердечных тканей, фиброз кожи (например, склеродермию), фиброз матки (например, эндометрия, миометрия), фиброз мышц (например, скелетных мышц) и фиброз костного мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления такая терапия может снизить или отсрочить потребность в трансплантации органов у пациентов. Согласно некоторым вариантам осуществления такая терапия может продлить выживаемость пациентов.

[697] Для лечения IPF пациенты, которые могут испытывать эффект от лечения, включают пациентов с семейным IPF и пациентов со спорадическим IPF. Введение терапевтически эффективного количества специфического в отношении изоформы ингибитора TGFβ1 может уменьшить накопление миофибробластов в тканях легких, уменьшить отложения коллагена, уменьшить симптомы IPF, улучшить или сохранить функцию легких и продлить выживаемость. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор блокирует активацию ECM-ассоциированного TGFβ1 (например, про/латентного TGFβ1, презентируемого LTBP1/3) в фиброзном окружении IPF. Ингибитор может дополнительно блокировать активацию ассоциированного с макрофагами TGFβ1 (например, про/латентного TGFβ1, презентируемого LRRC33), например, альвеолярными

макрофагами. В результате ингибитор может подавлять высвобождение фибронектина и других факторов, ассоциированных с фиброзом. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор блокирует активацию звездчатых клеток печени.

[698] Хорошо известно, что активация звездчатых клеток печени (HSC) является центральным фактором фиброза при повреждении печени. В этом процессе покоящиеся накапливающие витамин А клетки трансдифференцируются в пролиферативные фиброгенные миофибробласты (основной источник накопления белка внеклеточного матрикса (ECM)). Однако было продемонстрировано, что этот процесс опосредуется многими различными путями, включая аутофагию, стресс эндоплазматического ретикулума, окислительный стресс, метаболизм ретинола и холестерина, эпигенетику и опосредованные рецепторами сигналы. Кроме того, воспалительные клетки, включая макрофаги, гепатоциты, синусоидальные эндотелиальные клетки печени, естественные клетки-киллеры, естественные Т-клетки-киллеры, тромбоциты и В-клетки, также могут модулировать активацию HSC (Tsuchida and Friedman, Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology volume 14, pages 397–411 (2017)). В одном конкретном примере Seki et al продемонстрировали, что активация TLR4 (который распознает LPS, презентируемый бактериями) приводит к усилению секреции хемокинов и индуцирует хемотаксис клеток Купфера, а также сенсибилизирует HSC к сигналам, индуцированным TGFβ, и допускает неограниченную активацию клеток Купфера (Seki et al. Nature Medicine volume 13, pages 1324–1332 (2007)).

[699] Хорошо известно, что воспаление играет ключевую роль в развитии и прогрессировании фиброза печени. В частности, повреждение печени приводит к воспалению и рекрутингу моноцитов/макрофагов (а также лимфоцитов, эозинофилов и плазматических клеток), которые продуцируют профиброзные факторы, включая TGFβ. Более того, исследования показывают, что как резидентные для ткани печени макрофаги (клетки Купфера), так и рекрутированные макрофаги костного мозга играют важную роль в прогрессировании фиброза печени, и что путь с участием TGFβ может способствовать поляризации и профиброзным функциям макрофагов во время фиброза печени. Действительно, было продемонстрировано, что как клетки Купфера, так и рекрутированные макрофаги могут активировать HSC и индуцировать их трансдифференцировку в миофибробласты с помощью паракринных механизмов, включая TGFβ. Миофибробласты, в свою очередь, продуцируют и откладывают компоненты внеклеточного матрикса, ведущие к фиброзу (Fabregat и Caballero-Diaz, Front Oncol. 2018; 8: 357).

[700] Однако миофибробласты также могут происходить из других источников, включая портальные и резидентные фибробласты, фиброциты костного мозга,

эпителиальные клетки печени, которые подвергаются EMT, эндотелиальные клетки, которые подвергаются EndMT, и клетки гладких мышц сосудов и перициты. Действительно, было продемонстрировано, что TGFβ регулирует как EndMT, так и EMT, что приводит к увеличению количества миофибробластов, которые вызывают фиброз печени. (Pardali et al., Int J Mol Sci. 2017 Oct; 18(10): 2157). Соответственно, нацеливание на TGFβ было перспективной терапевтической мишенью для лечения фиброзных состояний.

[701] Было продемонстрировано, что TGFβ играет важную роль в фиброзе печени и прогрессировании заболевания. Например, было продемонстрировано, что TGFβ отвечает за активацию HSC в отношении миофибробластов. Также было продемонстрировано, что TGFβ опосредует эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) в гепатоцитах, что может способствовать повышению популяции миофибробластов. Более того, было продемонстрировано, что TGFβ вызывает изменения пластичности опухолевых клеток (Fabregat and Caballero-Diaz, Front Oncol. 2018; 8: 357).

[702] Хотя TGFβ может быть обнаружен во многих различных клеточных источниках в фиброзном и/или опухолевом микроокружении, что позволяет предположить презентацию TGFb множеством различных презентирующих молекул (например, LTBP1, LTBP3, GARP и/или LRRC33), в определенных ситуациях это может быть эффективным для нацеливания на определенные источники TGFβ по сравнению с другими. Например, Henderson et al. продемонстрировали, что при делеции интегрина αv в HSC защищенные мыши образуют CCl_4-индуцированный фиброз печени (Henderson et al, *Nat. Med.* 2013, 19, 1617-16-24). Поскольку интегрины являются основными активаторами TGFβ, презентируемого LTBP, этот результат предполагает, что нацеливание на TGFβ, презентируемый LTBP, может быть достаточным для лечения фиброза в определенных ситуациях. Однако, поскольку иммунные клетки играют важную роль в фиброзном ответе, ингибиторы TGFβ, которые нацелены на TGFβ, презентируемый большинством или всеми комплексами TGFβ с презентирующей молекулой, могут быть эффективными.

[703] В последние годы лечение фиброза печени стало предметом повышенного интереса в связи с его растущей распространенностью во всем мире. Например, неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) ассоциирована с метаболическими нарушениями, такими как ожирение, инсулинорезистентность, гипергликемия натощак, дислипидемия и измененные профили адипокинов. NAFLD характеризуется чрезмерным накоплением липидов в гепатоцитах и представляет собой спектр заболеваний, прогрессирующих от стеатоза печени (скопление липидных/жировых капель в гепатоцитах) до неалкогольного стеатогепатита (NASH), фиброза печени и, в наиболее тяжелых случаях, цирроза печени. NASH с фиброзом или циррозом повышает риск развития

гепатоцеллюлярной карциномы (HCC) (Starley BQ, et al. Hepatology 2010; 51: 1820-1832). Было предложено регулировать прогрессирование от стеатоза к NASH с помощью модели «множественных ударов», в которой первым ударом является инсулинорезистентность и нарушение обмена веществ, которые приводят к стеатозу печени, за которым следует окислительный стресс, провоспалительное цитокин-опосредованное повреждение гепатоцитов, измененное распределение липидов и гепатоксичность, опосредованная свободными жирными кислотами, аномальная нагрузка внутрипеченочного холестерина, гиперинсулинемия, гиперлептинемия и гипоадипонектинемия (Tilg H, Moschen AR, Hepatology 2010; 52: 1836–1846; and Yilmaz Y., Aliment Pharmacol Ther 2012; 36: 815-823).

[704] Хотя для изучения фиброза печени было разработано множество моделей на животных, можно использовать любые подходящие доклинические модели. Например, было продемонстрировано, что диета с высоким содержанием жиров у мышей имитирует как гистопатологию, так и патогенез NAFLD человека. Более того, некоторые генетические модели также отображают особенности метаболического синдрома человека и NAFLD, такие как модели мышей *db*/*db* и *ob*/*ob*. Существуют также животные модели для изучения NASH, которые в основном состоят из различных моделей, индуцированных диетой, включая, помимо прочего, диету с дефицитом метионина и холина (MCD), диету с высоким содержанием холестерина (HCD), диету с высоким содержанием жиров и дефицитом холина (CDHFD), диету с дефицитом холина и дефицитом L-аминокислот, диету с дефицитом холина и дефицитом L-аминокислот + тетрахлоридом углерода, диету с высоким содержанием жиров + стрептозотоцином, диету с высоким содержанием жиров + высоким содержанием холестерина (HFHC), диету с высоким содержанием фруктозы (HFD) и диету с высоким содержанием жиров и фруктозы и высоким содержанием фруктозы (HFHF). Генетические модели на мышах для исследования NASH включают без ограничения мышей foz/foz, гепатоцит-специфических мышей с дефицитом PTEN, мышей Db/db + диэтилнитрозамин (DEN) и мышей *db/db* + MCD. Подробности всех этих моделей, включая преимущества и недостатки каждой из них, изложены в Jennie Ka Ching Lau et al., *J Pathol* 2017; **241:** 36–44; содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[705] Другая модель, пригодная для исследования эффективности специфических в отношении изоформы ингибиторов TGFβ при фиброзе печени, включает модель четыреххлористого углерода (CCL_4). Другая модель, пригодная для исследования эффективности специфических в отношении изоформы ингибиторов TGFβ при фиброзе печени, включает модель лигирования желчных протоков (BDL) (см., например, Tag et al., *J Vis Exp.* 2015; (96): 52438).

[706] Специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, такие как предусмотренные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения фиброзных состояний печени, таких как жирная печень (например, неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) и неалкогольный стеатогепатит (NASH). Жирная печень может быть воспаленной или невоспаленной. Воспаление печени в результате жирной печени (например, стеатогепатит) может перерасти в рубцевание (фиброз), которое затем часто переходит в цирроз (рубцевание, которое искажает структуру печени и нарушает ее функцию). Следовательно, ингибитор можно использовать для лечения таких состояний. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор блокирует активацию ECM-ассоциированного TGFβ1 (например, про/латентного TGFβ1, презентируемого LTBP1/3) в фиброзном окружении печени. Ингибитор может необязательно блокировать активацию ассоциированного с макрофагами TGFβ1 (например, про/латентного TGFβ1, презентируемого LRRC33), например, клетками Купфера (также известными как звездчатые макрофаги), а также инфильтрирующими макрофагами, происходящими из моноцитов, и MDSC. В результате ингибитор может подавлять факторы, ассоциированные с фиброзом (например, фиброзные маркеры, описанные в настоящем документе). Введение ингибитора субъекту с такими состояниями может уменьшить один или несколько симптомов, предупредить или замедлить прогрессирование заболевания, уменьшить или стабилизировать накопление жира в печени, снизить биомаркеры, ассоциированные с заболеванием (например, фрагменты коллагена сыворотки крови), уменьшить рубцевание печени, снизить жесткость печени и/или иным образом привести к клинически значимому результату в популяции пациентов, получавших лечение ингибитором, по сравнению с контрольной популяцией, не получавшей ингибитор. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество ингибитора может обеспечить как снижение содержания жира в печени, так и уменьшение фиброза (например, рубцевания) у пациентов с NASH. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество ингибитора может обеспечить нормализацию фиброза по меньшей мере на одну стадию без ухудшения стеатогепатита у пациентов с NASH. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество ингибитора может снизить частоту возникновения печеночной недостаточности и/или рака печени у пациентов с NASH.

[707] Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество ингибитора может нормализовать по сравнению с контролем уровни нескольких воспалительных или фиброзных биомаркеров в сыворотке, которые оцениваются после начала терапии, например, через 12-36 недель. Согласно некоторым вариантам осуществления воспалительные или фиброзные биомаркеры можно использовать для

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

i) индекс жирной печени (BMI, окружность талии, триглицериды сыворотки крови и гамма-глутамилтрансферазу (GGT);

ii) индекс стеатоза печени (соотношение аспартатаминотрансфераза (AST):аланинаминотрансфераза (ALT) в сыворотке крови, BMI, пол и наличие сахарного диабета);

iii) показатель жирной печени при NAFLD (сывороточные уровни ALT, холестерина HDL, триглицеридов, гемоглобина A_{1c} и содержание лейкоцитов);

iv) SteatoTest (BioPredictive) (сывороточные уровни общего билирубина, GGT, α2-макроглобина, гаптоглобина, ALT, аполипопротеина AI, общего холестерина, триглицеридов, глюкозы (с поправкой на возраст и пол) и BMI); и

v) хребтовую шкалу NAFLD (сывороточные уровни ALT, холестерина HDL, триглицеридов, гемоглобина A_{1c}, содержание лейкоцитов и данные о сопутствующих заболеваниях (и наличие гипертензии)).

[708] Согласно некоторым вариантам осуществления для оценки уровней стеатоза печени можно использовать визуализирующие биомаркеры. Например, визуализирующие биомаркеры могут включать без ограничения: ультразвуковое исследование, контролируемый параметр затухания (CAP), жировую фракцию протонной плотности по оценке MRI (MRI-PDFF) и магнитно-резонансную спектроскопию (MRS).

[709] Биопсия печени является современным стандартом диагностики NASH, однако вариабельность среди патологов ограничивает эффективность такого способа диагностики. Соответственно, использование алгоритма подавления прогрессирования жирной печени (FLIP) (включающего показатели гистологического стеатоза, активности и фиброза) можно использовать для улучшения согласованности диагностики NASH с помощью биопсии. Более того, многие неинвазивные биомаркеры также могут быть пригодны для диагностики и мониторинга заболевания. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления воспалительные или фиброзные биомаркеры можно использовать для оценки степени тяжести NASH, выбора пациентов для лечения и/или мониторинга прогрессирования заболевания или ответа на лечение. Биомаркеры крови могут включать в себя:

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

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

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

iv) лизосомальные ферменты, такие как катепсин D; и

v) комбинированные панели, такие как NASHTest (BioPredictive) и NASH Diagnostics Panel (включающие наличие сахарного диабета, пол, BMI и уровни триглицеридов в сыворотке крови, фрагменты CK18 и общий CK18).

[710] Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркеры и связанные панели могут быть пригодными для диагностики уровней фиброза и/или цирроза, выбора пациентов для лечения и/или мониторинга прогрессирования заболевания или ответа на лечение. Например, неинвазивные исследования на фиброз и цирроз печени включают без ограничения: соотношение AST:ALT, индекс соотношения AST:тромбоцитов, индекс фиброза-4 (возраст, AST, ALT и содержание тромбоцитов), оценку фиброза при NAFLD (возраст, BMI, нарушение уровня глюкозы натощак и/или сахарный диабет, AST, ALT, содержание тромбоцитов и альбумин), оценку BARD (AST, ALT, BMI и сахарный диабет).

[711] Специфические маркеры и панели фиброза также могут быть пригодны и включают без ограничения: гиалуроновую кислоту; PIIPNP; Pro-C3; TIMP1; ламинин; расширенную панель фиброза печени (ELF) (PIINP, гиалуроновую кислоту, TIMP1); FibroTest (GGT, общий билирубин, α2m, аполипопротеин AI и гаптоглобин); и FibroMeter NAFLD (масса тела, протромбиновый индекс, ALT, AST, ферритин и глюкозу натощак). Визуализирующие биомаркеры фиброза печени могут включать без ограничения: FibroScan (TE), точечную эластографию сдвиговой волны (pSWE) (также известную как импульс силы акустического излучения (ARFI)), 2D-3D SWE, магнитно-резонансную эластографию (MRE) и многопараметрическую MRI.

[712] Согласно некоторым вариантам осуществления генетические и геномные биомаркеры могут быть пригодны для оценки риска и тяжести NAFLD, что включает оценку различных SNP, очищенных от клеток ncRNA и miRNA. Всесторонний обзор известных генетических и геномных биомаркеров, а также вышеупомянутых биомаркеров крови, панелей, визуализирующих биомаркеров и тестов обобщен в работе VWS Wong et al., Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2018 Aug;15(8):461-478; содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[713] Согласно некоторым вариантам осуществления у пациентов с NASH специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 можно вводить пациентам, которые получают одну или несколько дополнительных видов терапии, включая, помимо прочего, ингибиторы миостатина, которые, как правило, могут усиливать регуляцию

метаболизма у пациентов с клиническими проявлениями метаболического синдром, включая NASH и NAFLD.

[714] Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительная терапия может включать ингибитор TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ3 представляет собой специфический в отношении изоформы ингибитор TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ3 представляет собой контекстно-независимый или контекстно-зависимый ингибитор TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления пациента с NASH имеет TGFβ1-положительную и TGFβ3-положительную фиброзную ткань. Согласно некоторым вариантам осуществления пациент с NASH определен или был определен как частично ответивший на терапию ингибитором TGFβ1.

[715] Согласно некоторым вариантам осуществления у пациентов с NASH специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 можно вводить пациентам, которые получают ингибитор ацетил-КоА-карбоксилазы (ACCi) (например, фирсокостат (GS-0976) или PF-05221304). Другие терапевтические средства, которые могут быть пригодны в сочетании с улучшенными специфическими в отношении изоформы ингибиторами TGFβ1, описанными в настоящем документе, включают без ограничения: агонисты или аналоги рецептора GLP-1 (например, семаглутид), агонисты рецептора фарнезоида X (FXR) (например, GS-9674; также известный как цилофексор), ингибиторы ASK1 (например, селонсертиб); обетихолевую кислоту, агонисты PPAR (например, GFT505; также известный как элафибранор); нитазоксаниды, ингибиторы кетогексокиназы (KHK) (например, PF-06835919); и/или ингибиторы диацилглицерин-О-ацилтрансферазы 2 (DGAT2) (например, PF-06865571). Согласно некоторым вариантам осуществления любое одно или несколько из вышеупомянутых терапевтических средств можно использовать в комбинации со специфическим в отношении изоформы ингибитором TGFβ1 по настоящему раскрытию, например, специфическим в отношении изоформы ингибитором TGFβ1 в комбинации с агонистом FXR, ингибитором ACC и/или аналогом GLP-1. Согласно некоторым вариантам осуществления селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 можно использовать в комбинации с ингибитором миостатина, таким как ингибиторы активации миостатина (например, SRK-015, например, WO 2016/073853 и WO 2017/049011). Согласно некоторым вариантам осуществления селективные в отношении изоформе ингибиторы TGFβ1 можно использовать в комбинации с ингибитором GDF11, таким как ингибиторы активации GDF11 (например, WO 2017/015622).

[716] Согласно некоторым вариантам осуществления лечение специфическими в отношении изоформы ингибиторами TGFβ1 по отдельности или в комбинации с одним или

несколькими дополнительными терапевтическими средствами снижает содержание жира в печени, как измерено с помощью MRI-PDFF. Согласно некоторым вариантам осуществления снижение содержания жира в печени составляет по меньшей мере 20%, например, ≥ 20%, ≥ 25%, ≥ 30%, ≥ 35%, ≥ 40%, ≥ 45% или ≥ 50%. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение специфическими в отношении изоформы ингибиторами TGFβ1, отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, снижает сывороточную ALT и/или GGT на по меньшей мере 20%, например, ≥ 20%, ≥ 25%, ≥ 30%, ≥ 35%, ≥ 40%, ≥ 45% или ≥ 50%. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение специфическими в отношении изоформы ингибиторами TGFβ1 по отдельности или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами снижает синтез желчных кислот.

[717] Согласно некоторым вариантам осуществления пациенты с NASH могут иметь распространенный фиброз печени (стадия F3/F4). Согласно некоторым вариантам осуществления такие пациенты имеют распространенный фиброз печени стадии F3. Согласно некоторым вариантам осуществления такие пациенты имеют фиброз печени стадии F4, характеризующийся циррозом. Согласно некоторым вариантам осуществления у пациентов с NASH развивается гепатоцеллюлярная карцинома и/или варикозное расширение вен пищевода или существует риск их развития.

[718] Ниже приводится стадия фиброза при неалкогольной жировой болезни печени в соответствии с классификацией, разработанной Комитетом патологии сети центров клинических исследований неалкогольного стеатогепатита:

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

[719] Чтобы дать возможность оценить различные гистологические особенности во время терапии и охватить весь спектр NAFLD, Комитет патологии сети центров клинических исследований NASH (CRN) провел тщательный одномерный и многомерный анализ ассоциаций между различными гистологическими особенностями, наблюдаемыми при NASH, и диагнозом NASH в соответствии с Комитетом патологии. Результатом была

система оценки как активности NASH (степень), так и отложения коллагена и архитектурного ремоделирования (стадия). Система оценок, оценка активности NASH (NAS), представляла собой невзвешенную сумму трех гистологических компонентов: стеатоз (0-3), лобулярное воспаление (0-3) и баллонирующая дегенерация (0-2). Она варьировала от 0 до 8. NAS включает признаки активного повреждения, которые являются потенциально обратимыми. Кроме того, система определения стадий фиброза Brunt et al. получила дальнейшее развитие. В системе NASH CRN оценку фиброза для стадии 1 подразделяли на легкий (1A) и плотный (1B) перисинусоидальный фиброз, тогда как стадию 1C определяли как портальный фиброз без сопутствующего перисинусоидального фиброза (описано в обзоре Stål, World J Gastroenterol. 2015 Oct 21; 21(39): 11077–11087, включенном в настоящий документ посредством ссылки).

[720] Специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, такие как предусмотренные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения фиброзных состояний почек, например, заболеваний, характеризующихся накоплением внеклеточного матрикса (IgA-нефропатия, фокальный и сегментарный гломерулосклероз, серповидный гломерулонефрит, волчаночный нефрит и диабетическая нефропатия), при которых значительно повышена экспрессия TGFβ в клубочках и наблюдается тубулоинтерстиций. В то время как гломерулярное и тубулоинтерстициальное отложение двух компонентов матрикса, индуцированных TGFβ, фибронектином EDA+ и PAI-1, было значительно повышено при всех заболеваниях с накоплением матрикса, корреляционный анализ выявил тесную взаимосвязь в первую очередь с изоформой TGFβ1. Соответственно, ингибиторы TGFβ1, специфические в отношении изоформ, могут быть использованы в качестве терапевтических средств для лечения целого ряда гломерулярных заболеваний человека, при которых TGFβ ассоциирован с патологическим накоплением внеклеточного матрикса.

[721] Согласно некоторым вариантам осуществления фиброзное состояние почек ассоциировано с хроническим заболеванием почек (CKD). CKD вызывается в основном высоким кровяным давлением или сахарным диабетом и ежегодно уносит более миллиона жизней. Пациентам с CKD требуется пожизненная медицинская помощь, которая варьируется от строгой диеты и приема лекарственных средств до диализа и трансплантации. Согласно некоторым вариантам осуществления терапия ингибитором TGFβ1, описанная в настоящем документе, может снизить или отсрочить потребность в диализе и/или трансплантации. Согласно некоторым вариантам осуществления такая терапия может снизить потребность (например, дозировку, частоту) в других видах лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления специфические в отношении

изоформы ингибиторы TGFβ1 можно вводить пациентам, которые получают одну или несколько дополнительных видов терапии, включая, помимо прочего, ингибиторы миостатина, которые, как правило, могут усиливать регуляцию метаболизма у пациентов с CKD.

[722] Фиброзные состояния, которые можно лечить ингибитором TGFβ1 по настоящему изобретению, включают состояния, включающие фиброз и/или хроническое воспаление. Такие состояния могут представлять собой нервно-мышечные нарушения, включая, помимо прочего, мышечную дистрофию Дюшенна (DMD) и другие генетические нарушения, такие как рассеянный склероз (MS) и муковисцидоз (CF). Считается, что посредством ингибирования как ассоциированных с ECM-, так и с иммунными клетками фрагментов TGFβ1 ингибитор TGFβ1, такой как описанные в настоящем документе, подавляет прогрессирование фиброза и восстанавливает поляризацию макрофагов M1/M2.

[723] Модели, пригодные для изучения CKD и фиброза почек, включают, помимо прочего, линии мышей NZB/W, MRL/*lpr* и BXSB, модели с антителами к GBM, модели с антителами к Thy1, нефрэктомию 5/6, радиационную нефропатию, нефроз пуромицин-аминонуклеозида (PAN) и адриамициновую нефропатию, нефропатию фолиевой кислотой, нефропатию CyA, нефропатию, связанную с солью DOCA, ВИЧ-ассоциированную нефропатию (HIVAN), трансгенную мышиную модель, спонтанно гипертензивных крыс (SHR), крыс Buffalo/mna, мюнхенских крыс Wistar Frömter (MWF), крыс с односторонней обструкцией (UUO), мышей с нокаутом Col4A (синдром Альпорта) (см. Yang et al. Drug Discov Today Dis Models. 2010; 7(1-2): 13–19; содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[724] Фиброз органа, который можно лечить с помощью способов, предусмотренных в настоящем документе, включает фиброз сердца (например, сердечно-сосудистой системы). Согласно некоторым вариантам осуществления фиброз сердца ассоциирован с сердечной недостаточностью, например, с хронической сердечной недостаточностью (CHF). Согласно некоторым вариантам осуществления сердечная недостаточность может быть ассоциирована с заболеваниями миокарда и/или метаболическими заболеваниями. Согласно некоторым вариантам осуществления специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 можно вводить пациентам, которые получают одну или несколько дополнительных видов терапии, включая, помимо прочего, ингибиторы миостатина, у пациентов с сердечной дисфункцией, которая включает фиброз сердца и метаболическое нарушение.

[725] Генетические модели, пригодные для изучения фиброза сердца, включают без ограничения, мышь FAK-KO, специфическую в отношении сердечных миоцитов,

генетически модифицированных мышей SR-BI/apoE с двойным KO (dKO), мышей без синдекана-1, мышей со сверхэкспрессией EC-SOD, мыши с нокаутом PKC-δ. Хирургические мышиные модели, пригодные для изучения фиброза сердца, включают в себя, помимо прочего, лигирование коронарной артерии, модель ишемической реперфузии (открытая и закрытая грудная клетка), модель хронической ишемии, модель ишемии-реперфузии с ишемической моделью предварительного кондиционирования, модель Лангендорфа, поперечное сужение аорты (TAC), сужение восходящей аорты, спазм брюшной аорты, перевязку легочной артерии, TAC с перевязкой дистального отдела левой передней коронарной артерии, модель аортокавальной фистулы (ACF) и модель аортальной недостаточности (см. Rai et al., Mol Cell Biochem. 2017 Jan; 424(1-2): 123-145; содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[726] Согласно некоторым вариантам осуществления фиброзные состояния, которые можно лечить с помощью композиций и/или способов, описанных в настоящем документе, включают десмоплазию. Десмоплазия может возникать вокруг новообразования, вызывая плотный фиброз вокруг опухоли (например, десмопластическая строма) или рубцовая ткань в брюшной полости после абдоминального хирургического вмешательства. Согласно некоторым вариантам осуществления десмоплазия ассоциирована со злокачественной опухолью. Вследствие его плотного образования, окружающего злокачественное новообразование, обычные противораковые терапевтические средства (например, химиотерапия) могут не эффективно проникать в раковые клетки для достижения клинического эффекта. Специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, могут быть использованы для разрушения десмоплазии таким образом, что фиброзное образование может быть ослаблено для усиления эффектов противораковой терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления специфические в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 можно использовать в качестве монотерапии (подробнее см. ниже).

[727] Согласно некоторым вариантам осуществления пациент имеет фиброзную солидную опухоль (например, десмоплазию), и он исключен или был исключен из группы кандидатов на хирургическое вмешательство, поскольку фиброзная солидная опухоль считается нерезектабельной или неоперабельной. Такой пациент может представлять собой кандидата на получение терапии путем ингибирования TGFβ1 по настоящему раскрытию. Ингибитор TGFβ1 по настоящему изобретению может сделать опухоль резектабельной или операбельной после введения, так что пациент может стать кандидатом на хирургическую резекцию.

[728] Для лечения пациентов с фиброзными состояниями субъекту вводят ингибиторы, специфические в отношении изоформы TGFβ1, в количестве, эффективном для лечения фиброза. Эффективное количество такого антитела представляет собой количество, эффективное для достижения как терапевтической эффективности, так и клинической безопасности у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор представляет собой антитело, которое может блокировать активацию LTBP-опосредованного TGFβ1, локализованного (например, связанного) в ECM, и GARP-опосредованного TGFβ1, локализованного (например, связанного на) в иммунных клетках. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой антитело, которое может блокировать активацию LTBP-опосредованного TGFβ1, локализованного в ECM, и LRRC33-опосредованного TGFβ1, локализованного в (например, связанного на) моноцитах/макрофагах. Согласно некоторым вариантам осуществления LTBP представляет собой LTBP1 и/или LTBP3. Согласно некоторым вариантам осуществления нацеливание на TGFβ1, презентируемый LRRC33, и его ингибирование, на профиброзных M2-подобных макрофагах в фиброзном микроокружении может быть эффективным.

[729] Анализы, пригодные при определении эффективности антител и/или композиций по настоящему раскрытию для изменения фиброза, включают без ограничения гистологические анализы для подсчета фибробластов и основные иммуногистохимические анализы, известные в настоящей области техники.

[730] Согласно некоторым вариантам осуществления циркулирующий (циркулирующие) фрагмент (фрагмент) LAP можно использовать в качестве сывороточного маркера фиброгенеза. Антитела, которые специфически распознают расщепленные концы таких фрагментов, можно использовать для обнаружения фрагментов LAP в образцах сыворотки. См., например, патент США 8198412, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Роль TGFβ при сахарном диабете

[731] Потеря инсулинсекретирующих β-клеток в поджелудочной железе является основным механизмом сахарного диабета 2 типа. Недавние исследования предполагают роль лигандов семейства TGFβ в регуляции функции β-клеток и гомеостаза глюкозы. Эти лиганды могут влиять на пролиферацию β-клеток и/или включение новых β-клеток из предшественников у взрослых людей. Сообщалось, что генетические манипуляции, вызывающие сверхэкспрессию трансгенного TGF-β посредством промотора инсулина, вызывают снижение развития экзокринной поджелудочной железы и островков, поддержание контроля уровня глюкозы. Аналогичным образом, трансгенная

сверхэкспрессия TGF-β посредством промотора глюкагона, как сообщается, вызывает гипоплазию В-клеток, снижение секреции инсулина, нарушение толерантности к глюкозе (см., например, в работе Trends Endocrinol Metab. 2010 Jul; 21(7): 441-448). Экспансия и обновление бета-клеток поджелудочной железы имеет решающее значение как для нормального развития поджелудочной железы, так и для поддержания функции островка у взрослого человека. Недавно в нескольких исследованиях были определены некоторые ключевые функции передачи сигналов с участием TGFβ в развивающейся поджелудочной железе. В частности, передача сигналов с участием TGFβ способствует эндокринному коммитированию клеток-предшественников и их последующему созреванию. Мыши со сверхэкспрессией доминантно-отрицательной формы рецептора TGFβ II типа в работе Tulachan et al. ингибировали передачу сигналов с участием TGFβ на уровне рецепторов и обнаружили повышение количества эндокринных предшественников, а также пролиферацию эндокринных клеток. В островке у взрослого человека все три изоформы TGFβ экспрессируются в эндокринных клетках диффузным образом. Однако в инсулин-положительных клетках интенсивность была выше для TGFβ2 и TGFβ3. В экзокринной поджелудочной железе большинство ацинарных клеток были положительными в отношении TGFβ1, в то время как все три лиганда, по-видимому, одинаково экспрессировались в клетках протоков. Бета-клетки у взрослых людей имеют очень низкое обновление и низкую скорость пролиферации. Селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1, такой как описанный в настоящем документе, можно использовать для стимуляции репликации бета-клеток поджелудочной железы при лечении или профилактике сахарного диабета и/или нарушения толерантности к глюкозе. Поскольку репликация β-клеток является основным механизмом для поддержания и экспансии массы β-клеток в ответ на изменение потребности в инсулине, неэффективность такой адаптивной экспансии может привести к сахарному диабету (см., например, Dhawan et al., Diabetes. 2016 May; 65(5): 1208–1218), селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1 можно предпочтительно использовать для облегчения сахарного диабета, не вызывая нежелательных побочных эффектов, ассоциированных с ингибированием передачи сигналов с участием всех форм TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1 можно использовать в сочетании с селективным в отношении миостатина ингибитором (например, антителами, которые избирательно связывают про/латентный миостатин/GDH8, тем самым ингибируя активацию миостатина), как описано, например, в PCT/US2015/059468 и PCT/US2016/052014, в лечении или предупреждении сахарного диабета или нарушении

толерантности к глюкозе. Согласно некоторым вариантам осуществления сахарный диабет представляет собой сахарный диабет 2 типа.

[732] Состояния, связанные с сахарным диабетом, включают диабетическую нефропатию (DN), которую также называют диабетической болезнью почек. Диабетическая нефропатия представляет собой серьезное осложнение со стороны почек при сахарном диабете 1 и 2 типа. У до 40 процентов людей с сахарным диабетом в конечном итоге развивается болезнь почек. Со временем DN может привести к отеку легких, сердечно-сосудистым заболеваниям и терминальной стадии болезни почек, что в конечном итоге требует диализа или трансплантации почки для выживания.

[733] Основные клинические признаки DN человека включают альбуминурию, прогрессирующее снижение GFR и гипертонию, а также повышенный риск сердечно-сосудистых заболеваний. Патогенез DN связан с клубочковым ангиогенезом и гиперфильтрацией. Кроме того, у пациентов с DN наблюдаются утолщение базальной мембраны клубочков, разрастание мезангиальных клеток, гломерулосклероз и тубулоинтерстициальный фиброз. TGFβ1 и его рецепторы активируются как при экспериментальной диабетической нефропатии, так и при диабетической нефропатии человека. Сообщалось, что усиленная экспрессия рецепторов TGFβ1, биоактивность TGFβ1 и реакция на экзогенный TGFβ1 происходят в ответ на высокий уровень глюкозы в клетках клубочков, и внеклеточный аденозин, как предполагается, играет роль в этом процессе (см., например, Roa et al., (2009) "*Adenosine mediates transforming growth factor-beta 1 release in kidney glomeruli of diabetic rats*" FEBS Let 583(19): 3192-3198). Согласно некоторым вариантам осуществления DN включает нарушение регуляции биосинтеза аденозина или передачи сигналов. Согласно некоторым вариантам осуществления нарушение регуляции затрагивает CD39 и/или CD73.

Роль TGFβ в состояниях костно-мышечной системы

[734] В костно-мышечной системе, которая состоит из костей скелета, мышц, хрящей, сухожилий, связок, суставов и другой соединительной ткани, которая поддерживает и связывает ткани и органы вместе, TGFβ играет множество ролей, включая ингибирование пролиферации и дифференцировки, индукцию атрофии и развитие фиброза. TGFβ ослабляет пролиферацию клеток-сателлитов и предупреждает дифференцировку (посредством ингибирования MyoD и миогенина) (Allen, R.E. and L.K. J Cell Physiol, 1987. 133(3): p. 567-72; Brennan, T.J., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(9): p. 3822-6; Massague, J., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(21): p. 8206-10; Olson, E.N., et al., J Cell Biol, 1986. 103(5): p. 1799-805). Изоформа TGFβ (например, TGFβ1, 2 или 3) не определена

в этих ранних исследованиях, однако, предполагается, что она представляет собой TGFβ1. TGFβ также способствует фиброзу мышц; прямая инъекция рекомбинантного TGFβ1 приводит к фиброзу скелетных мышц, а ингибирование всех форм TGFβ уменьшает фиброз мышечной ткани при остром и хроническом повреждении (Li, Y., et al., Am J Pathol, 2004. 164(3): p. 1007-19; Mendias, C.L., et al., Muscle Nerve, 2012. 45(1): p. 55-9; Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21). TGFβ1 экспрессируется мышечными волокнами, макрофагами, регуляторными Т-клетками, фибробластами и фиброцитами в скелетной мышце (Li, Y., et al., Am J Pathol, 2004. 164(3): p. 1007-19; Lemos, D.R., et al., Nat Med, 2015. 21(7): p. 786-94; Villalta, S.A., et al., Sci Transl Med, 2014. 6(258): p. 258ra142; Wang, X., et al., J Immunol, 2016. 197(12): p. 4750-4761); и экспрессия повышается при повреждении и при заболевании (Li, Y., et al., Am J Pathol, 2004. 164(3): p. 1007-19; Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21; Bernasconi, P., et al., J Clin Invest, 1995. 96(2): p. 1137-44; Ishitobi, M., et al., Neuroreport, 2000. 11(18): p. 4033-5). TGFβ2 и TGFβ3 также активируются (на уровне мРНК) в мышечной ткани при наличии mdx, хотя в меньшей степени, чем TGFβ1 (Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21; Zhou, L., et al., Neuromuscul Disord, 2006. 16(1): p. 32-8). Pessina, et al. недавно использовали эксперименты по отслеживанию направления дифференцировки с демонстрацией того, что клетки различного происхождения в дистрофической мышечной ткани выбирают фиброгенный путь посредством TGFβ-зависимого пути (Pessina, P., et al., Stem Cell Reports, 2015. 4(6): p. 1046-60).

[735] Кость является крупнейшим хранилищем TGFβ в организме. Фактически, считается, что путь с участием TGFβ играет важную роль в гомеостазе и ремоделировании кости, по меньшей мере частично, за счет регуляции дифференцировки остеобластов и/или резорбции остеокластов кости. Этот процесс участвует как в нормальных, так и в аномальных ситуациях, которые при нарушении регуляции могут вызывать или усугублять заболевание, такое как состояния, связанные с костями, и рак. Таким образом, селективные ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения таких состояний. Согласно некоторым вариантам осуществления введение таких ингибиторов эффективно для восстановления или нормализации баланса резорбции костной ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ1 вводят субъектам в сочетании с другой терапией, такой как ингибитор миостатина и/или средства, усиливающие костную ткань, в качестве комбинированной терапии.

[736] Состояния костей (например, заболевания скелета) включают остеопороз, дисплазию, несовершенный остеогенез и рак кости. Известно, что помимо первичного рака

кости, который возникает в кости, многие злокачественные новообразования метастазируют в кости; они включают без ограничения рак молочной железы, рак легких (например, плоскоклеточную карциному), рак щитовидной железы, рак яичек, почечно-клеточную карциному, рак предстательной железы и множественную миелому.

[737] Среди состояний, связанных с костями, несовершенный остеогенез представляет собой генетическое заболевание, которое, как правило, вызывается мутациями, затрагивающими гены, кодирующие коллаген I типа, и приводит к чрезвычайно легкому разрушению хрупких костей. В настоящее время существует несколько вариантов лечения, при которых бисфосфонатные лекарственные средства остаются стандартом лечения. Антигены или антигенсвязывающие фрагменты, которые селективно ингибируют активацию TGFβ1, можно использовать для лечения несовершенного остеогенеза либо отдельно, в качестве монотерапии, либо в сочетании с другой терапией, направленной на лечение заболевания.

[738] Терапевтические эффекты ингибиторов TGFβ1, таких как описанные в настоящем документе, можно контролировать с помощью подходящих биомаркеров, таких как сывороточные маркеры образования (активность щелочной фосфатазы) или резорбции кости (устойчивая к тартрату кислая фосфатаза).

[739] Согласно некоторым вариантам осуществления такие состояния ассоциированы с мышечной слабостью.

[740] Согласно некоторым вариантам осуществления состояние костно-мышечной системы включает нарушение регуляции миогенных и немиогенных стволовых клеток/клеток-предшественников, ассоциированных с костно-мышечной системой, таких клетки-сателлиты. Селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1 может использоваться для стимуляции экспансии/дифференцировки миогенных и немиогенных стволовых клеток/клеток-предшественников.

[741] TGFβ1 может играть роль в фиброзных состояниях, которые сопровождают хроническое воспаление пораженной ткани, таких как мышечные дистрофии человека. Мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) представляет собой тяжелое прогрессирующее и в конечном итоге приводящее к летальному исходу заболевание, вызванное отсутствием дистрофина (Bushby, K., et al., Lancet Neurol, 2010. 9(1): p. 77-93). Отсутствие дистрофина приводит к повышенной восприимчивости к повреждению, вызванному сокращением, способствуя мышечной дегенерации (Petrof, B.J., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(8): p. 3710-4; Dellorusso, C., et al., J Muscle Res Cell Motil, 2001. 22(5): p. 467-75; Pratt, S.J., et al., Cell Mol Life Sci, 2015. 72(1): p. 153-64). Повторные циклы репарации способствуют хроническому воспалению, фиброзу, истощению пула клеток-сателлитов, в конечном итоге

потере подвижности и гибели (Bushby, K., et al., Lancet Neurol, 2010. 9(1): p. 77-93; McDonald, C.M., et al., Muscle Nerve, 2013. 48(3): p. 343-56). Экспрессия TGFβ1 значительно повышена у пациентов с DMD и коррелирует со степенью фиброза, наблюдаемого у этих пациентов (Bernasconi, P., et al., J Clin Invest, 1995. 96(2): p. 1137-44; Chen, Y.W., et al., Neurology, 2005. 65(6): p. 826-34). Избыточное отложение ECM оказывает отрицательное влияние на сократительную способность мышечной ткани и может ограничивать доступ к питательным веществам, поскольку мышечные волокна изолированы от своего кровоснабжения (Klingler, W., et al., Acta Myol, 2012. 31(3): p. 184-95). В последнее время дополнительные данные также указали на роль TGFβ1 в мышечных дистрофиях. Было обнаружено, что варианты LTBP4 модифицируют тяжесть заболевания у мыши и человека. У мышей вариант LTBP4 оказывает защитное действие у мышей, не имеющих дистрофина или γ-саркогликана (Coley, W.D., et al., Hum Mol Genet, 2016. 25(1): p. 130-45; Heydemann, A., et al., J Clin Invest, 2009. 119(12): p. 3703-12). У человека в двух группах независимо выявляли вариант LTBP4 в качестве защитного при DMD, замедляя утрату способности передвигаться не несколько лет (Flanigan, K.M., et al., Ann Neurol, 2013. 73(4): p. 481-8; van den Bergen, J.C., et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2015. 86(10): p. 1060-5). Несмотря на то, что природа генетических вариантов у мыши и человека отличается, у обоих видов защитный вариант приводит к сниженной передачи сигналов с участием TGFβ (Heydemann, A., et al., J Clin Invest, 2009. 119(12): p. 3703-12); Ceco, E., et al., Sci Transl Med, 2014. 6(259): p. 259ra144). Многие из функций TGFβ1 в биологии скелетных мышц были определены в результате экспериментов, в которых очищенный активный фактор роста вводили животным или добавляли к клеткам в культуре (Massague, J., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(21): p. 8206-10; Li, Y., et al., Am J Pathol, 2004. 164(3): p. 1007-19; Mendias, C.L., et al., Muscle Nerve, 2012. 45(1): p. 55-9). Учитывая важность клеточного контекста для специфических функций TGFβ1 (см., например, Hinck et al., Cold Spring Harb. Perspect. Biol, 2016. 8(12)), возможно, что некоторые из эффектов, наблюдаемых в этих экспериментах, не отражают эндогенную (эндогенные) функцию (функции) этого цитокина in vivo. Например, обработка фибробластов дермы человека рекомбинантным TGFβ1, миостатином или GDF11 приводит к почти одинаковым изменениям экспрессии генов в этих клетках, несмотря на то, что функции этих белков in vivo весьма отличаются (Tanner, J.W., Khalil, A., Hill, J., Franti, M., MacDonnell, S.M., Growth Differentiation Factor 11 Potentiates Myofibroblast Activation, в Fibrosis: From Basic Mechanisms to Targeted therapies. 2016: Keystone, CO).

[742] Многие исследователи использовали ингибиторы TGFβ для выяснения функции этого фактора роста in vivo. Обработка мышей с наличием mdx нейтрализующим

антителом ко всем формам TGFβ 1D11 отчетливо приводит к уменьшению фиброза (на основе гистологического анализа и содержания гидроксипролина), уменьшению мышечного повреждения (сниженное содержание сывороточной креатинкиназы и повышенная плотность мышечных волокон) и улучшенной мышечной функции (по результатам плетизмографии, генерации силы изолированными EDL-мышцами и повышенной силе захвата передними конечностями) (Nelson, C.A., et al., Am J Pathol, 2011. 178(6): p. 2611-21; Andreetta, F., et al., J Neuroimmunol, 2006. 175(1-2): p. 77-86; Gumucio, J.P., et al., J Appl Physiol (1985), 2013. 115(4): p. 539-45). Кроме того, специфическая в отношении мышечных волокон экспрессия доминантно-негативного рецептора TGFβ II типа оказывает защитное действие от мышечного разрушения после кардиотоксического повреждения и у δ-саркогликан-/- мышей (Accornero, F., et al., Hum Mol Genet, 2014. 23(25): p. 6903-15). Протеогликан декорин, который находится в избытке в скелетных мышцах и ингибирует активность TGFβ, уменьшает мышечный фиброз у мышей с наличием mdx и после повреждения вследствие разрыва (Li, Y., et al., Mol Ther, 2007. 15(9): p. 1616-22; Gosselin, L.E., et al., Muscle Nerve, 2004. 30(5): p. 645-53). Другие молекулы с ингибирующей активностью в отношении TGFβ, такие как сурамин (антинеопластическое средство) и лозартан (блокатор ангиотензинового рецептора) были эффективны в нормализации патологии мышечной ткани и уменьшении фиброза в моделях повреждения у мышей, при синдроме Марфана и мышечной дистрофии (Spurney, C.F., et al., J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011. 16(1): p. 87-95; Taniguti, A.P., et al., Muscle Nerve, 2011. 43(1): p. 82-7; Bedair, H.S., et al., Am J Sports Med, 2008. 36(8): p. 1548-54; Cohn, R.D., et al., Nat Med, 2007. 13(2): p. 204-10). Несмотря на то, что все из терапевтических средств, описываемых выше, ингибируют TGFβ1 или передачу сигнала с его участием, ни одно из них не является специфическим для изоформы TGFβ1. Например, 1D11 связывается с изоформами TGFβ1, 2 и 3 и ингибирует их (Dasch, J.R., et al., J Immunol, 1989. 142(5): p. 1536-41). Сурамин ингибирует способность нескольких факторов роста связываться со своими рецепторами, в том числе PDGF, FGF и EGF, помимо TGFβ1 (Hosang, M., J Cell Biochem, 1985. 29(3): p. 265-73; Olivier, S., et al., Eur J Cancer, 1990. 26(8): p. 867-71; Scher, H.I. and W.D. Heston, Cancer Treat Res, 1992. 59: p. 131-51). Декорин также ингибирует активность миостатина, как в результате прямого связывания, так и посредством активации фоллистатина, ингибитора миостатина (Miura, T., et al., Biochem Biophys Res Commun, 2006. 340(2): p. 675-80; Brandan, E., C. Cabello-Verrugio, and C. Vial, Matrix Biol, 2008. 27(8): p. 700-8; Zhu, J., et al., J Biol Chem, 2007. 282(35): p. 25852-63). Лозартан влияет на дополнительные пути передачи сигнала в результате его эффектов на ренин-ангиотензин-альдостероновую систему, в том числе путь с участием IGF-1/AKT/mTOR (Burks, T.N., et al., Sci Transl Med,

2011. 3(82): p. 82ra37; Sabharwal, R. and M.W. Chapleau, Exp Physiol, 2014. 99(4): p. 627-31; McIntyre, M., et al., Pharmacol Ther, 1997. 74(2): p. 181-94). Таким образом, все из этих лекарственных средств ингибируют дополнительные молекулы, которые могут способствовать их терапевтических эффектам, а также токсичности.

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

[744] Соответственно, настоящее изобретение предусматривает способы лечения поврежденных мышечных волокон с применением средства, которое предпочтительно модулирует подгруппу, но не все из эффектов TGFβ in vivo. Такие средства могут селективно модулировать передачу сигналов с участием TGFβ1 («специфическая в отношении изоформы модуляция»).

Репарация мышечных волокон при хронических мышечных заболеваниях

[745] Настоящее изобретение предусматривает способы улучшения качества и функционирования мышечной ткани у пациентов с DMD, в результате ограничения фиброза и содействия нормализации морфологии и функционирования мышечной ткани. Поскольку TGFβ1 также ингибирует миогенез, то блокада TGFβ1 может способствовать регенерации дистрофической мышечной ткани, при этом добавляется дополнительный терапевтический эффект. Ингибиторы TGFβ1 можно использовать в комбинации с лекарственными средствами, направленными на активацию дистрофина, такими как Эксондис 51 (Этеплирсен). Учитывая потенциальные терапевтические эффекты ингибирования TGFβ1 при мышечной дистрофии, важным является (1) разграничение функции (функций) TGFβ1 от таковых TGFβ2 и TGFβ3, и (2) выяснение того, в каком (каких) молекулярном (молекулярных) контексте (контекстах) ингибирование TGFβ1 было бы наиболее эффективным. Как было упомянуто выше, ингибиторы всех форм TGFβ были ассоциированы со значительной токсичностью, ограничивая клиническое применение этих соединений (Anderton, M.J., et al., Toxicol Pathol, 2011. 39(6): p. 916-24; Stauber, A., et al., Clinical Toxicology, 2014. 4(3): p. 1-10). Неясно, какая из этих изоформ TGFβ вызывает эту токсичность. Некоторые из описываемых видов токсичности могут возникать благодаря ингибированию TGFβ1 в иммунной системе. Например, несмотря на то, что 1D11

значительно снижает уровни фиброза в диафрагме, обработка также повышает содержание CD4+ и CD8+ Т-клеток в мышечной ткани, свидетельствуя о повышенном воспалительном ответе в ответ на ингибирование всех форм TGFβ, которое могло оказывать отрицательный эффект при длительном лечении (Andreetta, F., et al., J Neuroimmunol, 2006. 175(1-2): p. 77-86). Фактически истощение Т-клеток в мышечной ткани нормализует патологию мышечной ткани у мышей с наличием mdx, свидетельствуя о том, что опосредованные Т-клетками воспалительные реакции оказывают отрицательное воздействие на дистрофическую мышечную ткань (Spencer, M.J., et al., Clin Immunol, 2001. 98(2): p. 235-43). Повышение количества Т-клеток при введении 1D11 происходит, по-видимому, благодаря эффектам TGFβ1 на регуляторные Т-клетки (Treg). Treg презентируют TGFβ1 на своей клеточной поверхности посредством GARP, и высвобождение TGFβ1 из этого комплекса усиливает супрессорную активность Treg, таким образом, ограничивая опосредованное Т-клетками воспаление (Wang, R., et al., Mol Biol Cell, 2012. 23(6): p. 1129-39; Edwards, J.P., A.M. Thornton, and E.M. Shevach, J Immunol, 2014. 193(6): p. 2843-9; Nakamura, K., et al., J Immunol, 2004. 172(2): p. 834-42; Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, J Exp Med, 2001. 194(5): p. 629-44). Фактически, истощение Treg при применении антитела PC61 приводило к повышенному воспалению и повреждению мышечной ткани в диафрагме мышей с наличием mdx, в то время как повышение числа и активности Treg приводило к ослаблению повреждения мышечной ткани (Villalta, S.A., et al., Sci Transl Med, 2014. 6(258): p. 258ra142). Интересным является то, что недавно была идентифицирована дополнительная популяция иммуносупрессорных Т-клеток, Tr1-клетки. Эти клетки продуцируют большие количества TGFβ3, который требуется для его супрессорной активности (Gagliani, N., et al., Nat Med, 2013. 19(6): p. 739-46; Okamura, T., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(33): p. 13974-9; Okamura, T., et al., Nat Commun, 2015. 6: p. 6329). Несмотря на то, что функция клеток Tr1 неизвестна, существует возможность того, что ингибирование как TGFβ1, так и TGFβ3 со стороны 1D11, могло оказывать дополнительные провоспалительные эффекты в результате ингибирования как клеток Treg, так и клеток Tr1.

[746] Структурные представления, описываемые выше в отношении латентности и активации TGFβ1, обеспечивают новые подходы для разработки лекарственных средств, которые специфически целенаправленно воздействуют на активацию TGFβ1 (Shi, M., et al., Nature, 2011. 474(7351): p. 343-9). Высокая степень идентичности последовательностей, общих для трех зрелых факторов роста TGFβ, не является общей для латентных комплексов, способствуя разработке антител, которые являются высокоспецифическими в отношении proTGFβ1. Применяя запатентованные подходы к разработке антител, авторы настоящего изобретения идентифицировали антитела (Ab1, Ab2 и Ab3), которые

специфически связываются с proTGFβ1. С помощью системы кокультивирования in vitro, было продемонстрировано, что эти антитела ингибируют опосредованное интегрином высвобождение TGFβ1. В этой системе фибробласты, происходящие из кожи человека или скелетных мышц мыши, являются источником латентного TGFβ1, клеточная линия, экспрессирующая αVβ6, обеспечивает высвобождение активного TGFβ1, который затем измеряют с помощью третьей клеточной линии, экспрессирующей восприимчивый к SMAD2/3 люциферазный репортер (фиг. **12**). Одно из этих антител, Ab1, исследовали in vivo и оно продемонстрировало эффективность в модели UUO (односторонней обструкции мочеточника) фиброза почек у мышей. В этой модели обработка мышей (n = 10) Ab1 в дозе 9 мг/кг/неделя предупреждала активацию TGFβ1-восприимчивых генов и уменьшала степень фиброза после повреждения (путем окрашивания пикросириусом красным). Специфические в отношении TGFβ1 лекарственные средства могут иметь улучшенные профили эффективности и безопасности по сравнению с ингибиторами всех форм TGFβ, что является важным аспектом, который бы длительно использовался, как в популяции с DMD. Ингибирующие антитела к TGFβ1 можно применять для определения того, является ли специфическое ингибирование в отношении TGFβ1 перспективным в качестве лекарственного средства для лечения DMD или других мышечных заболеваний, и для выяснения функции TGFβ1 в регенерации скелетных мышц.

Хронические и острые повреждения мышечных волокон и выбор оптимальных лекарственных средств

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

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

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

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

[751] В ситуация, когда LRRC33 экспрессируется преимущественно на M2-клетках и где его презентация TGFβ1 («контекст») является важным для пролечебных ранозаживляющих эффектов этих клеток, может быть предпочтительным активация LRRC33-опосредованного TGFβ1 в целях активации репарации и/или миогенеза. С другой стороны, в ситуациях, где LRRC33 также экспрессируется на провоспалительных M1-клетках, может быть предпочтительным ингибирование LRRC33-опосредованного TGFβ1, учитывая, что воспаление регулирует фиброз, особенно в условиях дистрофии, такой как DMD. Таким образом, идентификация источника/контекста ассоциированного с заболеванием TGFβ1 может быть важным этапом в выборе соответствующего модулятора передачи сигналов с участием TGFβ, который будет представлять информацию о том, какой уровень селективности должен учитываться (например, специфические в отношении изоформы контекстно-независимые модуляторы TGFβ1 или контекстно-специфические модуляторы TGFβ1; ингибиторы или активаторы TGFβ1 и т.д.).

[752] Помимо хронического воспаления, отличительным признаком DMD является избыточный и прогрессирующий фиброз. При запущенном заболевании фиброз является настолько тяжелым, что при нем мышечные волокна могут фактически изолироваться от своего кровоснабжения. При нем также изменяются сократительные свойства мышцы. У пациентов-людей имеется сильная корреляция между степенью активации TGFβ1 и фиброзом, и сильная связь между степенью фиброза и отрицательными последствиями, связанными с подвижностью. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы LTBP-proTGFβ1 можно вводить пациентам с дистрофией для предупреждения и/или уменьшения фиброза в целях селективного нацеливания на ECM-

ассоциированные эффекты TGFβ1 при заболевании. Согласно некоторым вариантам осуществления различные селективные в отношении изоформы и/или контекстно-селективные средства, описываемые в настоящем документе, можно применять для достижения ингибирования передачи сигналов с участием TGFβ1 в целях предупреждения фиброза и активации миогенеза, не вызывая нежелательных эффектов в отношении иммунной системы (например, посредством GARP или LRRC33).

Состояния, связанные со снижением экспрессии или мутацией MHC

[753] Показания, связанные с TGFβ, также могут включать состояния, при которых главный комплекс гистосовместимости (MHC) I класса имеет делецию или недостаточность (например, снижение экспрессии). Такие состояния включают генетические нарушения, при которых нарушается один или несколько компонентов передачи сигналов, опосредованной MHC, а также состояния, при которых экспрессия MHC изменяется другими факторами, такими как рак, инфекции, фиброз и лекарственные средства.

[754] Например, снижение экспрессии MHC I класса в опухоли связано с ускользанием опухоли от иммунологического надзора. Действительно, стратегии иммунологического ускользания, направленные на избежание распознавания Т-клетками, включая потерю экспрессии опухолевых MHC I класса, обычно обнаруживаются в злокачественных клетках. Было обнаружено, что ускользание от опухолевого иммунитета оказывает отрицательное влияние на клинический исход иммунотерапии рака, включая лечение антителами, блокирующими молекулы иммунных контрольных точек (см., например, обзор в работе Garrido et al. (2017) Curr Opin Immunol 39: 44-51. “The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy”, включенной в настоящий документ посредством ссылки). Таким образом, селективные в отношении изоформы контекстно-независимые ингибиторы TGFβ1, охватываемые настоящим раскрытием, можно вводить либо в виде монотерапии, либо в сочетании с другой терапией (такой как ингибитор контрольной точки, химиотерапия, лучевая терапия и т.д.) для стимуляции или усиления противоракового иммунитета и/или усиления восприимчивости или эффективности другой терапии.

[755] Согласно некоторым вариантам осуществления снижение экспрессии MHC ассоциировано с приобретенной устойчивостью к терапии рака, такой как CBT. Предполагается, что высокоаффинные селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 можно использовать для лечения пациентов, которые являются первично ответившими на терапию рака, такой как CBT, для снижения вероятности развития

приобретенной устойчивости. Таким образом, среди получающих лечение ингибитором TGFβ1, которые являются первично ответившими на терапию рака, появление вторичной или приобретенной устойчивости к терапии рака с течением времени может быть уменьшено.

[756] Снижение экспрессии белков MHC I класса также ассоциировано с некоторыми инфекционными заболеваниями, включая вирусные инфекции, такие как ВИЧ. См., например, работу Cohen et al. (1999) Immunity 10(6): 661-671. “The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK Cells”, включенную в настоящий документ посредством ссылки. Таким образом, селективные в отношении изоформы контекстно-независимые ингибиторы TGFβ1, охватываемые настоящим раскрытием, можно вводить либо в виде монотерапии, либо в сочетании с другой терапией (такой как противовирусная терапия, терапия ингибиторами протеазы и т.д.) для стимуляции или усиления иммунитета хозяина и/или усиления восприимчивости к другой терапии или ее эффективности.

Состояния, включающие самообновление стволовых клеток, регенерацию тканей и репопуляцию стволовых клеток

[757] Данные свидетельствуют о том, что TGFβ1 играет роль в регуляции гомеостаза различных популяций стволовых клеток и их дифференцировке/репопуляции в ткани. Во время гомеостаза тканеспецифические стволовые клетки преимущественно находятся в состоянии покоя, но стимулируются для вхождения в клеточный цикл при определенном стрессе. Считается, что TGFβ1 функционирует в качестве «разрыва» во время процесса, который строго регулирует дифференцировку и восстановление стволовых клеток, а стресс, запускающий вхождение в клеточный цикл, совпадает с ингибированием TGFβ1, устраняющим «разрыв». Таким образом, предполагается, что селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, такие как описанные в настоящем документе, могут быть использованы для отклонения или коррекции клеточного цикла и принятия решения о вхождении в G0 стволовых клеток/клеток-предшественников в конкретной ткани.

[758] Соответственно, авторы настоящего раскрытия рассматривают возможность использования селективных в отношении изоформы ингибиторов TGFβ1 в условиях, в которых: i) дифференцировка/восстановление стволовых клеток/клеток-предшественников прекращена или нарушена в результате заболевания или индуцируется в качестве побочного эффекта терапии/опосредования; ii) пациенты получают терапию или опосредование, которые вызывают гибель или истощение здоровых клеток; iii) пациенты

могут получить эффект от повышения дифференцировки/восстановления стволовых клеток/клеток-предшественников; iv) заболевание ассоциировано с аномальной дифференцировкой или восстановлением стволовых клеток.

[759] В самообновляющихся тканях, таких как костный мозг (образование клеток крови) и эпидермис, баланс между процессами пролиферации и дифференцировки строго регулируется, чтобы обеспечить сохранение популяции стволовых клеток в течение всей жизни. См. обзор в работе D'Arcangel et al. (2017) Int. J Mol Sci. 18(7): 1591. TGFβ1 выступает в качестве эффективного отрицательного регулятора клеточного цикла и супрессора опухоли, частично за счет индукции ингибиторов циклин-зависимых киназ, p15/INK4b, p21 и p57. Данные свидетельствуют о том, что TGFβ1 способствует индукции p16/INK4a и p19/ARF, опосредуя остановку роста и старение в определенных типах клеток. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления высокоаффинный селективный в отношении изоформы ингибитор активации TGFβ1, такой как описанный в настоящем документе, используется для регулирования p16/INK4a-зависимого клеточного старения и динамики стволовых клеток в различных популяциях стволовых клеток.

[760] Например, мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (MSC) представляют собой небольшую популяцию стромальных клеток, присутствующих в большинстве соединительных тканей взрослого человека, таких как костный мозг, жировая ткань и пуповинная кровь. MSC поддерживаются в относительном состоянии покоя in vivo, но в ответ на множество физиологических и патологических стимулов способны пролиферировать, а затем дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, адипоциты или другие клоны мезодермального типа, такие как гладкомышечные клетки (SMC) и кардиомиоциты. Множественные сигнальные сети организуют дифференцировку MSC в функциональные мезенхимальные клоны, среди которых TGF-β1 стал ключевым фактором (см., обзор, например, работы Zhao & Hantash (2011. Vitam Horm 87:127-41).

[761] Аналогичным образом гемопоэтические стволовые клетки необходимы для образования клеток крови на протяжении всей жизни; чтобы предупредить истощение, большинство гемопоэтических стволовых клеток остаются в состоянии покоя во время стабильного гемопоэза. Однако во время гематологического стресса эти клетки быстро рекрутируются в клеточный цикл и подвергаются значительному самообновлению и дифференцировке, чтобы удовлетворить повышенные гематопоэтические потребности. TGFβ1 может функционировать в качестве «переключателя» для контроля перехода/баланса между покоем и репопуляцией.

[762] Таким образом, селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 могут быть использованы в лечении состояний, включающих дефекты гемопоэтических

стволовых клеток и недостаточность костного мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления истощение или нарушение резервуара гематопоэтических стволовых клеток приводит к гематопоэтической недостаточности или гематологическим злокачественным новообразованиям. Согласно некоторым вариантам осуществления такие состояния представляют собой нарушение репарации ДНК, характеризующееся прогрессирующей недостаточностью костного мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления такое состояние вызвано истощением стволовых клеток и клеток-предшественников. Согласно некоторым вариантам осуществления такие состояния ассоциированы с анемией. Согласно некоторым вариантам осуществления такое состояние представляет собой анемию Фанкони (FA). Согласно некоторым вариантам осуществления такие состояния характеризуются гиперактивным путем с участием TGFβ, который подавляет выживание определенных типов клеток при повреждении ДНК. Таким образом, предполагается, что селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 можно использовать для устранения дефектов пролиферации гематопоэтических стволовых клеток при FA и/или недостаточности костного мозга у субъектов с FA. См., например, Zhang et al. (2016), Cell Stem Cell, 18: 668-681, “TGF-β inhibition rescues hematopoietic stem cell defects and bone marrow failure in Fanconi Anemia.”

Состояния, связанные с нарушением регуляции кроветворения, вызванным лечением

[763] Признано, что определенные лекарственные средства, которые разработаны для лечения различных патологических состояний, часто вызывают или обостряют анемию у пациента, которого лечат (например, анемию, вызванную лечением или лекарственными средствами, такую как анемию, вызванную химиотерапией, и анемию, вызванную лучевой терапией). Согласно некоторым вариантам осуществления пациента лечат миелосупрессорным лекарственным средством, которое может вызывать побочные эффекты, включая анемию. Такому пациенту может быть эффективно фармакологическое ингибирование TGFβ1 для усиления гематопоэза. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор TGFβ1 может способствовать гематопоэзу у пациентов, предупреждая переход в состояние покоя. Согласно некоторым вариантам осуществления пациент может получать терапию G-CSF (например, филграстимом).

[764] Соответственно, настоящее изобретение предусматривает применение селективного в отношении изоформы ингибитора TGFβ1, такого как раскрываемые в настоящем документе, для введения пациентам, получающим миелосупрессорную терапию (например, терапию с побочными эффектами, включая миелосупрессорные эффекты).

Примеры миелосупрессорной терапии включают без ограничения: пегинтерферон альфа-2a, интерферон альфа-n3, пегинтерферон альфа-2b, альдеслейкин, гемтузумаб озогамицин, интерферон альфакон-1, ритуксимаб, ибритумомаб, тиуксетан, тозитумомаб, алемтузумаб, бевацизумаб, L-фенилаланин, бортезомиб, кладрибин, кармустин, амсакрин, хлорамбуцил, ралтитрексед, митомицин, бексаротен, виндезин, флоксуридин, тиогуанин, винорелбин, дексразоксан, сорафениб, стрептозоцин, гемцитабин, тенипозид, эпирубицин, хлорамфеникол, леналидомид, альтретамин, зидовудин, цисплатин, оксалиплатин, циклофосфамид, фторурацил, пропилтиоурацил, пентостатин, метотрексат, карбамазепин, винбластин, линезолид, иматиниб, клофарабин, пеметрексед, даунорубицин, иринотекан, метимазол, этопозид, дакарбазин, темозоломид, такролимус, сиролимус, мехлорэтамин, азацитидин, карбоплатин, дактиномицин, цитарабин, доксорубицин, гидроксимочевину, бусульфан, топотекан, меркаптопурин, талидомид, мелфалан, флударабин, флуцитозин, капецитабин, прокарбазин, триоксид мышьяка, идарубицин, ифосфосфамид, митоксантрон, ломустин, паклитаксел, доцетаксел, дазатиниб, децитабин, неларабин, эверолимус, вориностат, тиотепу, иксабепилон, нилотиниб, белиностат, трабектидин, трастузумаб, эмтансин, темсиролимус, босутиниб, бендамустин, кабазитаксел, эрибулин, руксолитиниб, карфизобим, тофацитиниб, понатиниб, помалидомид, обинутузумаб, тедизолид фосфат, блинатумомаб, ибрутиниб, палбоциклиб, олапариб, динутуксимаб и колхицин.

[765] Дополнительные связанные с TGFβ показания могут включать любое раскрываемых в публикации США № 2013/0122007, патенте США № 8415459 или международной публикации № WO 2011/151432, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[766] Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитела, их антигенсвязывающие части и композиции по настоящему раскрытию можно применять для лечения самых различных заболеваний, нарушений и/или состояний, ассоциированных с передачей сигналов с участием TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления ткани-мишени/клетки-мишени предпочтительно экспрессируют изоформу TGFβ1 по сравнению с другими изоформами. Таким образом, настоящее изобретение предусматривает способы лечения такого состояния, ассоциированного с экспрессией TGFβ1 (например, нарушение регуляции передачи сигналов с участием TGFβ1 и/или повышение экспрессии TGFβ1) с использованием фармацевтической композиции, которая содержит антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе.

[767] Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание затрагивает TGFβ1, ассоциированный с несколькими клеточными источниками (например, презентируемый на них или отложенный из них). Согласно некоторым вариантам

осуществления такое заболевание включает как иммунный компонент, так и компонент ECM функции TGFβ1. Согласно некоторым вариантам осуществления такое заболевание включает в себя: i) нарушение регуляции ECM (например, сверхпродуцирование/отложение компонентов ECM, таких как коллагены и протеазы; изменение жесткости субстрата ECM; аномальную или патологическую активацию или дифференцировку фибробластов, таких как миофибробласты, фиброциты и CAF); ii) подавление иммунитета вследствие повышения Treg и/или подавления эффекторных Т-клеток (Teff), например, повышенных соотношений Treg/Teff; повышение инфильтрата лейкоцитов (например, макрофагов и MDSC), которое вызывает подавление CD4 и/или CD8 Т-клеток; и/или iii) аномальную или патологическую активацию, дифференцировку и/или рекрутинг миелоидных клеток, таких как макрофаги (например, моноциты/макрофаги, происходящие из костного мозга, и тканевые резидентные макрофаги), моноциты, супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC), нейтрофилы, дендритные клетки и NK-клетки.

[768] Согласно некоторым вариантам осуществления состояние затрагивает TGFβ1, презентируемый более чем одним типом презентирующих молекул (например, двумя или более из: GARP, LRRC33, LTBP1 и/или LTBP3). Согласно некоторым вариантам осуществления пораженные ткани/органы/клетки содержат TGFβ1 из нескольких клеточных источников. В качестве одного из примеров, солидная опухоль (которая может также включать пролиферативное заболевание, затрагивающее костный мозг, например, миелофиброз и множественную миелому) может содержать TGFβ1 из нескольких источников, таких как раковые клетки, стромальные клетки, окружающие здоровые клетки и/или инфильтрирующие иммунные клетки (например, CD45+ лейкоциты) с участием различных типов презентирующих молекул. Соответствующие иммунные клетки включают без ограничения миелоидные клетки и лимфоидные клетки, например, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, лимфоциты (например, В-клетки, Т-клетки и NK-клетки) и моноциты. Контекстно-независимые ингибиторы TGFβ1 могут быть пригодны для лечения таких состояний.

[769] Неограничивающие примеры состояний или нарушений, которые можно лечить с помощью специфических в отношении изоформы контекстно-независимых ингибиторов TGFβ1, таких как антитела или их фрагменты, описанные в настоящем документе, представлены ниже.

Схема лечения, введение

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

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

[772] Как используется в настоящем документе, термины «эффективное количество» и «эффективная доза» относятся к любому количеству или дозе соединения или композиции, которые являются достаточными для достижения предполагаемой

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

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

[774] В одном примере дозировки антитела, как описано в настоящем документе, могут быть определены эмпирически у индивидуумов, которым было назначено одно или несколько введений антитела. Индивидуумам вводят возрастающие дозы антагониста. Для определения эффективности можно отслеживать показатель TGFβ-ассоциированного

показания. Например, способы измерения повреждения мышечных волокон, репарации мышечных волокон, уровней воспаления в мышечной ткани и/или уровней фиброза в мышечной ткани хорошо известные специалистам в настоящей области техники.

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

[776] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, как описано в настоящем документе, не являются токсичными при введении субъекту. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, как описано в настоящем документе, характеризуются сниженной токсичностью при введении субъекту по сравнению с антителом, которое специфически связывается как TGFβ1, так и с TGFβ2. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, как описано в настоящем документе, характеризуются сниженной токсичностью при введении субъекту по сравнению с антителом, которое специфически связывается как TGFβ1, так и с TGFβ3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части, как описано в настоящем документе, характеризуются сниженной токсичностью при введении субъекту по сравнению с антителом, которое специфически связывается с TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3.

[777] Как правило, для введения любого из антител, описанных в настоящем документе, начальная доза кандидата может составлять приблизительно 1-20 мг/кг на одно введение, например, еженедельно, каждые 2 недели, каждые 3 недели, ежемесячно и т.д. Например, пациенты могут получать инъекцию приблизительно 1-10 мг/кг в 1 неделю, в 2 недели, в 3 недели или в 4 недели и т.д. в количестве, эффективном для лечения заболевания (например, рака), при этом количество хорошо переносится (в пределах допустимой токсичности или нежелательных явлений).

[778] Для целей настоящего раскрытия типичная доза (на одно введение, такое как инъекция и инфузия) может составлять от приблизительно 0,1 мг/кг до 30 мг/кг, в зависимости от факторов, упомянутых выше. Для повторных введений в течение

нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продолжается до достижения необходимого подавления симптомов или до достижения достаточных терапевтических уровней, необходимых для нормализации TGFβ-ассоциированного показания или его симптомов. Например, подходящая эффективная доза для Ab6 может составлять от 1 мг/кг до 30 мг/кг (например, 1-10 мг/кг, 1-15 мг/кг, 3-20 мг/кг, 5-30 мг/кг и т.д.), вводимая два раза в неделю, один раз в неделю, каждые две недели, каждые 4 недели или один раз в месяц. Подходящая эффективная доза Ab6 включает приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, например, вводимая еженедельно.

[779] Иллюстративный режим дозирования включает введение начальной дозы с последующими одной или несколькими поддерживающими дозами. Например, начальная доза может составлять от приблизительно 1 до 30 мг/кг, например, один раз в неделю или два раза в неделю. После этого поддерживающая (поддерживающие) доза (дозы) может (могут) составлять, например, от приблизительно 0,1 до 20 мг/кг, например, один раз в неделю, раз в две недели, один раз в месяц и т.д. Однако могут быть пригодны другие режимы дозирования, в зависимости от паттерна фармакокинетического разложения, которого хочет достичь практикующий врач. Фармакокинетические эксперименты продемонстрировали, что концентрация антитела, раскрываемого в настоящем документе (например, Ab3), в сыворотке крови остается стабильной по меньше мере в течение 7 дней после введения в доклинической животной модели (например, мышиной модели). Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что стабильность после введения может быть предпочтительной, поскольку антитело можно вводить менее часто, при этом поддерживая клинически эффективную концентрацию в сыворотке крови у субъекта, которому антитела вводят (например, субъекту-человеку). Согласно некоторым вариантам осуществления частота дозирования составляет один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 4 недели, один раз в 5 недель, один раз в 6 недель, один раз в 7 недель, один раз в 8 недель, один раз в 9 недель или один раз в 10 недель; или один раз в месяц, один раз в два месяца или один раз в 3 месяца или дольше. Результативность такой терапии легко отслеживается при помощи стандартных методик и анализов. Режим дозирования (в том числе используемое антитело) может варьировать в течение времени.

[780] Согласно некоторым вариантам осуществления для взрослого пациента с нормальной массой тела можно вводить дозы, варьирующие от приблизительно 0,3 до 5,00 мг/кг. Определенный режим дозирования, например, доза, время и повторение, будет зависеть от конкретного индивидуума и анамнеза этого индивидуума, а также свойств

отдельных средств (таких как период полужизни средства и другие соответствующие факторы).

[781] Концентрации высокоаффинного селективного в отношении изоформы антитела в сыворотке крови, которые терапевтически эффективны для лечения показаний, связанных с TGFβ1, в соответствии с настоящим раскрытием могут составлять по меньшей мере приблизительно 10 мкг/мл, например, от приблизительно 10 мкг/мл до 1,0 мг/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективные количества антитела, как измерено с помощью концентраций в сыворотке крови, составляют приблизительно 20-400 мкг/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективные количества антитела, как измерено с помощью концентраций в сыворотке крови, составляют приблизительно 100-800 мкг/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективные количества антитела, как измерено с помощью концентраций в сыворотке крови, составляют по меньшей мере приблизительно 20 мкг/мл, например, по меньшей мере приблизительно 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 150 мкг/мл или 200 мкг/мл. Как подробно описано в Примере 12 в настоящем документе, у отличных от человека приматов не наблюдали токсических эффектов (например: отсутствие кардиотоксичности, гиперплазии и воспаления, стоматологические и десневые признаки), связанных с Ab6 после поддержания уровней концентрации в сыворотке крови приблизительно 2000-3000 мкг/мл в течение по меньшей мере 8 недель. Следовательно, может быть достигнуто приблизительно 10-100-кратное терапевтическое окно.

[782] Для целей настоящего раскрытия подходящая доза антитела, которое связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, будет зависеть от конкретного применяемого антитела (или композиций на его основе), типа и тяжести показания, вне зависимости от того, вводится ли антитело в превентивных или терапевтических целях, предшествующей терапии, анамнеза пациента и ответа на антагонист, а также усмотрения лечащего врача. Согласно некоторым вариантам осуществления врач будет вводить антитело, которое специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, до тех пор, пока не будет достигнута доза, которая приводит к необходимому результату. Введение антитела, которое специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1, комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, может быть непрерывным или периодическим, в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, вне зависимости от того, является цель введения профилактической или терапевтической, и других факторов, известных практикующим врачам. Введение антитела, которое специфически связывает комплекс GARP-TGFβ1,

комплекс LTBP1-TGFβ1, комплекс LTBP3-TGFβ1 и/или комплекс LRRC33-TGFβ1, может быть в значительно степени непрерывным в течение предварительно выбранного периода времени или может представлять собой последовательность из распределенной во времени дозы, например, до, во время или после развития TGFβ-ассоциированного показания.

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

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

[785] Мыши DBA2/J имеют делецию из 40 п.о. в аллеле LTBP4. Нарушение регуляции ECM, с которым латентный TGFb1 ассоциирован, может представлять для воздействия эпитоп, с котором связывается Ab1. Могут наблюдаться заболевания, при которых эпитоп, с которым связывается Ab1, становится представленным для воздействия, и такие заболевания могут представлять собой терапевтически противоположные состояния в отношении Ab1, если показано ингибирование TGFb1.

Комбинированная терапия

[786] Настоящее раскрытие дополнительно предусматривает фармацевтические композиции и соответствующие способы, применяемые в качестве видов комбинированной терапии для лечения субъектов, которые могут иметь положительный результат вследствие ингибирования TGFβ in vivo. В соответствии с любыми из этих вариантов осуществления такие субъекты могут получать виды комбинированной терапии, которые включают в себя первую композицию, содержащую по меньшей мере один ингибитор TGFβ, например, антитело или его антигенсвязывающая часть, описываемые в настоящем документе, в сочетании со второй композицией, содержащей по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, предусмотренное для лечения того же самого или перекрывающегося заболевания или клинического состояния. Как первая, так и вторая композиции могут действовать на одну и ту же клеточную мишень или различные клеточные мишени. Согласно некоторым вариантам осуществления первая и вторая композиции могут лечить или облегчать одну и ту же или перекрывающуюся группу симптомов или аспектов заболевания или клинического состояния. Согласно некоторым вариантам осуществления первая и вторая композиции могут лечить или облегчать отдельную группу симптомов или аспектов заболевания или клинического состояния. Например, первая композиция может лечить заболевание или состояние, ассоциированное с передачей сигнала с участием TGFβ, в то время как вторая композиция может лечить воспаление или фиброз, ассоциированные с тем же самым заболеванием и т.д. Такие виды комбинированной терапии можно вводить в сочетании друг с другом. Фраза «в сочетании с» в контексте видов комбинированной терапии означает, что терапевтические эффекты первого терапевтического средства перекрываются во времени и/или в пространстве с терапевтическими эффектами второго терапевтического средства у субъекта, получающего комбинированную терапию. Таким образом, виды комбинированной терапии можно разрабатывать в виде одной лекарственной формы для совместного введения или в виде отдельных составов для последовательного введения терапевтических средств.

[787] Согласно предпочтительным вариантам осуществления виды комбинированной терапии приводят к синергическим эффектам при лечении заболевания. Термин «синергический» относится к эффектам, которые являются большими, чем аддитивные эффекты (например, более высокая эффективность) каждого вида монотерапии в совокупности.

[788] Согласно некоторым вариантам осуществления виды комбинированной терапии, описываемые в настоящем документе, приводят к эффективности, которая в целом

эквивалента таковой, образующейся в результате действия другой терапии (такого как монотерапия вторым средством), однако ассоциированы с меньшим нежелательным побочным эффектом или менее выраженной токсичностью, ассоциированной со вторым средством по сравнению с монотерапией вторым средством. Согласно некоторым вариантам осуществления такие виды комбинированной терапии способствуют введению меньшей дозы второго средства, однако поддерживают общую эффективность. Такие виды комбинированной терапии могут быть особенно подходящими для популяций пациентов, в которых требуется длительное лечение, и/или включающих пациентов детского возраста.

[789] Соответственно настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции и способы применения видов комбинированной терапии для снижения активации белка TGFβ1 и лечения или предупреждения заболеваний или состояний, ассоциированных с передачей сигналов с участием TGFβ1, как описано в настоящем документе. Соответственно способы или фармацевтические композиции дополнительно предусматривают второе терапевтическое средство. Согласно некоторым вариантам осуществления второе лекарственное средство может быть применимым для лечения или предупреждения заболеваний или состояний, ассоциированных с передачей сигналов с участием TGFβ1. Второе терапевтическое средство может нормализовать или лечить по меньшей мере один симптом, ассоциированный с целевым заболеванием. Первое и второе терапевтические средства могут оказывать свои биологические эффекты в результате аналогичных или несвязанных механизмов действия; или как один, так и оба из первого и второго лекарственных средств могут оказывать свои биологические эффекты в результате множества механизмов действия.

[790] Следует понимать, что фармацевтические композиции, описываемые в настоящем документе, могут содержать первое и второе терапевтические средства в том же самом фармацевтически приемлемом носителе или в другом фармацевтически приемлемом носителе для каждого описываемого варианта осуществления. Также следует понимать, что первое и второе терапевтические средства можно вводить одновременно или последовательно в соответствии с описываемыми вариантами осуществления.

[791] Одно или несколько антител к TGFβ или их антигенсвязывающих частей по настоящему изобретению можно применять в комбинации с одним или несколькими из дополнительных терапевтических средств. Примеры дополнительных терапевтических средств, которые можно применять с антителом к TGFβ по настоящему изобретению, включают без ограничения: противораковые вакцины, различные виды терапии на основе сконструированных иммунных клеток, различные виды химиотерапии, различные виды лучевой терапии, модулятор представителя суперсемейства TGFβ, такой как ингибитор

миостатина и ингибитор GDF11; агонист VEGF; агонист IGF1; агонист FXR; ингибитор CCR2; ингибитор CCR5; двойной ингибитор CCR2/CCR5; ингибитор CCR4, ингибитор соединения, подобного лизилоксидазе-2; ингибитор ASK1; ингибитор ацетил-КоА-карбоксилазы (ACC); ингибитор киназы p38; пирфенидон; нинтеданиб; ингибитор M-CSF (например, антагонист рецептора M-CSF и нейтрализующие M-CSF средства); ингибитор MAPK (например, ингибитор Erk), агонист или антагонист иммунных контрольных точек; антагонист IL-11; и антагонист IL-6 и т.п. Другие примеры дополнительных терапевтических средств, которые можно применять с ингибиторами TGFβ, включают без ограничения ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), ингибитор аргиназы, ингибитор тирозинкиназы, ингибитор Ser/Thr-киназы, ингибитор киназы с двойной специфичностью. Согласно некоторым вариантам осуществления такое средство может представлять собой ингибитор PI3K, ингибитор PKC или ингибитор JAK.

[792] Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор контрольных точек. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство выбирают из группы, состоящей из антагониста PD-1, антагониста PDL1, слитого белка PD-L1 или PDL2, антагониста CTLA4, агониста GITR, антитела к ICOS, антитела к ICOSL, антитела к B7H3, антитела к B7H4, антитела к TIM3, антитела к LAG3, антитела к OX40 (агониста OX40), антитела к CD27, антитела к CD70, антитела к CD47, антитела к 41BB, антитела к PD-1, онколитического вируса и ингибитора PARP. Согласно некоторым вариантам осуществления высокоаффинный контекстно-независимый ингибитор активации TGFβ1, раскрываемый в настоящем документе, применяют в лечении рака у субъекта, который представляет собой неэффективного ответившего или неответившего на терапию ингибированием контрольных точек, такую как перечисленная в настоящем документе.

[793] Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство связывает молекулу костимуляции Т-клеток, такую как ингибирующие костимуляцию молекулы и активирующие костимуляцию молекулы. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство выбирают из группы, состоящей из антитела к CD40, антитела к CD38, антитела к KIR, антитела к CD33, антитела к CD137 и антитела к CD74.

[794] Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительная терапия представляет собой лучевую терапию. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство представляет собой химиотерапевтическое средство. Согласно некоторым вариантам осуществления химиотерапевтическим средством является таксол. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство представляет

собой противовоспалительное средство. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство ингибирует процесс рекрутинга моноцитов/макрофагов и/или инфильтрацию тканей. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор активации звездчатых клеток печени. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство представляет собой антагонист хемокинового рецептора, например, антагонисты CCR2 и антагонисты CCR5. Согласно некоторым вариантам осуществления такой антагонист хемокинового рецептора представляет собой антагонист с двойной специфичностью, такой как антагонист CCR2/CCR5. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство, подлежащее введению в виде комбинированного лекарственного средства, представляет собой представителя суперсемейства TGFβ факторов роста или их регуляторов или содержит его. Согласно некоторым вариантам осуществления такое средство выбирают из модуляторов (например, ингибиторов и активаторов) GDF8/миостатина и GDF11. Согласно некоторым вариантам осуществления такое средство представляет собой ингибитор передачи сигналов с участием GDF8/миостатина. Согласно некоторым вариантам осуществления такое средство представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывает про/латентный комплекс миостатина и блокирует активацию миостатина. Согласно некоторым вариантам осуществления моноклональное антитело, которое специфически связывает про/латентный комплекс миостатина и блокирует активацию миостатина, не связывает свободный зрелый миостатин.

[795] Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительная терапия включает клеточную терапию, такую как CAR-T-терапия.

[796] Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительная терапия представляет собой противораковую вакцину. Многочисленные клинические испытания противораковых вакцин на основе пептидов были направлены на гематологические злокачественные новообразования (рак крови), меланому (рак кожи), рак молочной железы, рак головы и шеи, гастроэзофагеальный рак, рак легких, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, и различные виды колоректального рака. Антигены включали пептиды из HER2, теломеразы (TERT), сурвивина (BIRC5) и белка опухоли Вильмса 1 (WT1). В нескольких испытаниях также использовали «персонализированные» смеси из 12-15 различных пептидов. Т.е., они содержат смесь пептидов из опухоли пациента, против которой у пациента проявляется иммунный ответ. Некоторые испытания нацелены на солидные опухоли, глиому, глиобластому, меланому и рак молочной железы, шейки матки, яичников, различные виды колоректального и немелкоклеточного рака легких и включают антигены из MUC1, IDO1 (индолеамин-2,3-диоксигеназа), CTAG1B и

двух рецепторов VEGF, FLT1 и KDR. Примечательно, что вакцину IDO1 исследуют на пациентах с меланомой в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек ипилимумабом и ингибитором BRAF (гена) вемурафенибом.

[797] Неограничивающие примеры опухолевых антигенов, пригодных в качестве противораковых вакцин, включают в себя: NY-ESO-1, HER2, HPV16 E7 (Papillomaviridae № E7), CEA (карциноэмбриональный антиген), WT1, MART-1, gp100, тирозиназу, URLC10, VEGFR1, VEGFR2, сурвивин, MUC1 и MUC2.

[798] Однако активированные иммунные клетки, примированные такой противораковой вакциной, могут быть исключены из TME частично посредством TGFβ1-зависимых механизмов. Для преодоления иммуносупрессии можно рассмотреть возможность применения высокоаффинных контекстно-независимых ингибиторов TGFβ1 по настоящему изобретению для раскрытия перспективности вакцины.

[799] Комбинированные виды терапии, рассматриваемые в настоящем документе, могут преимущественно применять более низкие дозы вводимых терапевтических средств, что позволяет избежать возможных токсических эффектов или осложнений, ассоциированных с различными видами монотерапии. Согласно некоторым вариантам осуществления применение специфического в отношении изоформы ингибитора TGFβ1, описанного в настоящем документе, может сделать более восприимчивыми тех, кто неэффективно реагирует или не реагирует на терапию (например, стандарт лечения). Согласно некоторым вариантам осуществления применение специфического в отношении изоформы ингибитора TGFβ1, описанного в настоящем документе, может позволить снизить дозировку лекарственного препарата (например, стандарта лечения), которая по-прежнему обеспечивает эквивалентную клиническую эффективность у пациентов, но с меньшей токсичностью или меньшей ее степенью или меньшими нежелательными явлениями, связанными с лекарственными средствами.

[800] Согласно некоторым вариантам осуществления селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, рассматриваемые в настоящем документе, можно применять в сочетании с (например, комбинированной терапией, дополнительной терапией и т.д.) селективным в отношении изоформы ингибитором TGFβ3. Такое применение может дополнительно включать дополнительную терапию, такую как терапия рака, например, ингибитор иммунных контрольных точек, противораковая вакцина, лучевая терапия и/или химиотерапия.

[801] Согласно некоторым вариантам осуществления селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, рассматриваемые в настоящем документе, можно применять

в сочетании с (например, комбинированной терапией, дополнительной терапией и т.д.) селективным ингибитором миостатина (GDF8).

Диагностика, выбор пациентов, мониторинг

[802] Терапевтические способы, включающие терапию ингибированием TGFβ1, могут включать диагностику показания к TGFβ1 и/или выбор пациентов, которые могут ответить на такую терапию. Кроме того, пациенты, которые получают ингибитор TGFβ1, могут подлежать мониторингу в отношении терапевтических эффектов лечения, что, как правило, включает измерение одного или нескольких подходящих параметров, которые указывают на состояние и которые могут быть измерены (например, проанализированы) до и после лечения и оценки изменения параметров, связанные с лечением. Например, такие параметры могут включать уровни биомаркеров, присутствующих в биологических образцах, взятых у пациентов. Биомаркеры могут быть на основе РНК, на основе белков, на основе клеток и/или на основе тканей. Например, гены, которые сверхэкспрессируются при определенных патологических состояниях, могут выступать в качестве биомаркеров для диагностики и/или мониторинга заболевания или ответа на терапию. Белки клеточной поверхности ассоциированных с заболеванием клеточных популяций могут выступать в качестве биомаркеров. Такие способы могут включать прямые измерения параметров заболевания, указывающих на степень конкретного заболевания, таких как размер/объем опухоли. Могут быть использованы любые подходящие способы отбора образцов, такие как образцы сыворотки крови/крови, различные виды биопсии и визуализация. Биопсия может включать различные виды биопсии ткани (например, опухоли) и различные виды жидкой биопсии.

[803] Хотя различные виды биопсии традиционно представляли собой стандарт диагностики и мониторинга различных заболеваний, таких как фиброз (например, фиброз органов) и пролиферативные нарушения (например, рак), менее инвазивные альтернативы могут быть предпочтительны. Например, многие неинвазивные методики визуализации in vivo можно использовать для диагностики, мониторинга и выбора пациентов для лечения. Таким образом, настоящее изобретение предусматривает применение методик визуализации in vivo для диагностики и/или мониторинга заболевания у пациента или субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления пациент или субъект получают специфический в отношении изоформы ингибитор TGFβ1, как описано в настоящем документе. В соответствии с другими вариантами осуществления можно применять способ визуализации in vivo для выбора пациентов для лечения ингибитором TGFβ1, специфическим в отношении изоформ. Согласно некоторым вариантам осуществления

такие методики можно применять для определения того, реагируют ли или как реагируют пациенты на терапию, например, терапию ингибированием TGFβ1.

[804] Примеры методик визуализации in vivo, применяемых для способов, включают без ограничения рентгеновскую радиографию, магнитно-резонансную томографию (MRI), медицинское ультразвуковое исследование или ультразвуковое исследование, эндоскопию, эластографию, тактильную визуализацию, термографию, медицинскую фотографию. Другие методики визуализации включают функциональную визуализацию ядерной медицины, например, позитронно-эмиссионную томографию (PET) и однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (SPECT). Способы проведения этих методик и анализа результатов известны в настоящей области техники.

[805] Неинвазивные методики визуализации, обычно применяемые для диагностики и мониторинга рака, включают, помимо прочего: магнитно-резонансную томографию (MRI), компьютерную томографию (CT), ультразвуковое исследование, позитронно-эмиссионную томографию (PET), однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (SPECT), флуоресцентно-отражательную томографию (FRI) и флуоресцентно-опосредованную томографию (FMT). Платформы гибридной визуализации также можно использовать для диагностики и мониторинга рака. Например, гибридные методики включают без ограничения: PET-CT, FMT-CT, FMT-MRI и PET-MRI. MRI с динамическим контрастным усилением (DCE-MRI) представляет собой еще одну методику визуализации, обычно используемую для выявления различных видов рака молочной железы. Способы проведения этих методик и анализа результатов известны в настоящей области техники.

[806] Неинвазивные методики визуализации, обычно используемые для диагностики и мониторинга фиброза, включают, помимо прочего: ультразвуковое исследование (например, обычное ультразвуковое исследование или ультразвуковое исследование с контрастным усилением), ультразвуковую эластографию (например, переходную эластографию, точечную эластографию сдвиговой волной и двухмерную сдвиговую волнообразную эластографию), визуализацию с помощью CT (например, обычной CT или CT-перфузии), магнитно-резонансную томографию (MRI) (например, обычную MRI, магнитно-резонансную эластографию, диффузионно-взвешенную магнитно-резонансную томографию, визуализацию с помощью динатрия гадоксетовой кислоты и магнитно-резонансную томографию-перфузию).

[807] Согласно некоторым вариантам осуществления неинвазивные методики визуализации используют для оценки уровней фиброза печени или стеатоза печени. Например, методики визуализации, особенно пригодные для оценки фиброза печени, могут включать без ограничения: FibroScan (временную эластографию; TE), точечную

эластографию сдвиговой волны (pSWE, также известную как импульс силы акустического излучения (ARFI)), 2D-3D SWE, магнитно-резонансную эластографию (MRE) и многопараметрическую MRI. Методики визуализации, особенно пригодные для оценки стеатоза печени, могут включать без ограничения: ультразвуковое исследование, контролируемый параметр затухания (CAP), эластографию, жировую фракцию протонной плотности по оценке MRI (MRI-PDFF) и магнитно-резонансную спектроскопию (MRS). Согласно некоторым вариантам осуществления методику визуализации in vivo используют для оценки жесткости печени. Согласно некоторым вариантам осуществления методику визуализации in vivo используют для обнаружения и оценки внутрипеченочных уровней триглицеридов. Согласно некоторым вариантам осуществления методику визуализации in vivo используют для оценки узловатости поверхности печени (LSN; также известной как «показатель печени»), жесткости печени и/или соотношения сегментарного объема печени (LSVR), все из которых являются пригодными для определения стадии фиброза печени и определения типа стадий цирроза. Способы проведения этих методик и анализа результатов известны в настоящей области техники.

[808] Совсем недавно были разработаны неинвазивные способы визуализации, которые позволят обнаруживать клетки, представляющий интерес (например, цитотоксические Т-клетки, макрофаги и раковые клетки), in vivo. См. например, www.imaginab.com/technology/; работы Tavare et al. (2014) PNAS, 111(3): 1108-1113; Tavare et al. (2015) J Nucl Med 56(8): 1258-1264; Rashidian et al. (2017) J Exp Med 214(8): 2243-2255; Beckford Vera et al. (2018) PLoS ONE 13(3): e0193832; и Tavare et al. (2015) Cancer Res 76(1): 73-82, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки. Так называемое «отслеживание Т-клеток» направлено на обнаружение и локализацию противоопухолевых эффекторных Т-клеток in vivo. Это может дать полезную информацию для понимания иммуносупрессорного фенотипа солидных опухолей. Опухоли, которые достаточно инфильтрированы цитотоксическими Т-клетками («воспаленные» или «горячие» опухоли), скорее всего, поддаются лечению рака, например, терапии блокадой контрольных точек (CBT). С другой стороны, опухоли с иммуносупрессорными фенотипами имеют тенденцию к слабой инфильтрации Т-лимфоцитов даже при наличии противоопухолевого иммунного ответа. Эти так называемые «иммунно-исключенные» опухоли, вероятно, не поддаются различным видами терапии рака, таким как CBT. Методики отслеживания Т-клеток могут выявить эти различные фенотипы и предоставить информацию для руководства терапевтическим подходом, от которого, вероятно, пациенты извлекут пользу. Например, пациенты с «иммунно-исключенной» опухолью, вероятно, будут испытывать эффект от терапии ингибитором TGFβ1 для того, чтобы облегчить

обращение иммуносупрессорного фенотипа. Предполагается, что аналогичные методики можно использовать для диагностики и мониторинга других заболеваний, например, фиброза. Обычно антитела или антителоподобные молекулы, сконструированные с помощью детекторного фрагмента (например, радиоактивной метки, флуоресценции и т.д.), можно вводить пациенту, который затем будет распространяться и локализоваться в очагах конкретного маркера (например, макрофагов CD8+ макрофагов и макрофагов M2).

[809] Неинвазивные методики визуализации in vivo можно применять во множестве подходящих способов для целей диагностики пациентов; выбора или идентификации пациентов, которые могут испытывать эффект от терапии ингибитором TGFβ1; и/или мониторинга пациентов в отношении терапевтического ответа на лечение. Любые клетки с известным маркером клеточной поверхности можно обнаружить/локализовать посредством использования антитела или подобных молекул, которые специфически связываются с клеточным маркером. Обычно клетки, которые должны быть обнаружены с помощью таких методик, представляют собой иммунные клетки, такие как цитотоксические Т-лимфоциты, регуляторные Т-клетки, MDSC, ассоциированные с заболеванием макрофаги (макрофаги M2, такие как TAM и FAM), NK-клетки, дендритные клетки и нейтрофилы.

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

[811] Методики визуализации in vivo, описанные выше, можно использовать для обнаружения, локализации и/или отслеживания определенных MDSC у пациента, которому поставлен диагноз заболевания, ассоциированного с TGFβ1, такого как рак и фиброз. Здоровые индивидуумы в кровотоке не имеют MDSC или имеют их низкую частоту встречаемости. С началом или прогрессированием такого заболевания могут быть обнаружены повышенные уровни циркулирующих и/или ассоциированных с заболеванием MDSC. Например, сообщалось, что CCR2-положительные M-MDSC накапливаются в тканях с воспалением и могут вызывать прогрессирование фиброза в ткани (например, фиброза легких), и это, как продемонстрировано, коррелирует с экспрессией TGFβ1. Аналогичным образом, MDSC обогащены в ряде солидных опухолей (включая трижды негативный рак молочной железы) и частично способствуют иммуносупрессорному фенотипу TME. Следовательно, ответ на лечение терапией, ингибирующей TGFβ1, в соответствии с настоящим раскрытием, можно контролировать путем локализации или

отслеживания MDSC. Снижение или низкая частота выявляемых MDSC, как правило, указывает на терапевтический эффект или более благоприятный прогноз.

[812] Известно, что многие виды рака у человека вызывают повышенные уровни MDSC у пациентов по сравнению со здоровым контролем (см., например, в работе Elliott et al. (2017) “Human tumor-infiltrating myeloid cells: phenotypic and functional diversity” Frontiers in Immunology, Vol. 8, Article 86). Эти виды рака у человека включают без ограничения: рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак молочной железы, глиобластому, гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак легких, меланому, NSCL, рак яичников, рак поджелудочной железы и почечно-клеточную карциному. Повышенные уровни MDSC могут быть обнаружены в биологических образцах, таких как мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и образцы тканей (например, биоптат опухоли). Например, частота или изменения количества MDSC могут быть измерены как: процент (%) от общего количества PBMC, процент (%) CD14+ клеток, процент (%) CD45+ клеток; процент (%) мононуклеарных клеток, процент (%) всех клеток, процент (%) CD11b+ клеток, процент (%) моноцитов, процент (%) нелимфоцитарных MNC, процент (%) KLA-DR клеток, используя подходящие маркеры клеточной поверхности (фенотип).

[813] Кроме того, с помощью маркеров иммунных клеток в случае рака можно определить, имеет ли опухоль иммунно-исключенный фенотип. Если установлено, что опухоль имеет иммунно-исключенный фенотип, терапия рака (например, CBT) в отдельности может быть неэффективной, поскольку опухоль не имеет достаточного количества цитотоксических клеток в окружении опухоли. Таким образом, дополнительная терапия ингибитором TGFβ1, таким как описанные в настоящем документе, может снизить иммуносупрессию, тем самым делая опухоль, устойчивую к терапии рака, более восприимчивой к терапии рака. Предполагается, что иммунные маркеры также можно использовать для отслеживания иммунных клеток в фиброзном контексте и/или определения состава иммунных клеток фиброзной ткани (например, для отслеживания присутствия макрофагов и/или миофибробластов).

[814] Соответственно, настоящее изобретение также предусматривает способ лечения заболевания или состояния, связанного с TGFβ1, который может включать следующие этапы: i) выбор пациента, которому поставлен диагноз заболевания или состояния, связанного с TGFβ1; и, ii) введение пациенту антитела или фрагмента, охваченного настоящим документом, в количестве, эффективном для лечения заболевания или состояния. Согласно некоторым вариантам осуществления этап выбора (i) включает обнаружение маркеров заболевания (например, маркеров фиброза или рака, как описано в

настоящем документе), при этом необязательно обнаружение включает анализ биоптата, анализ маркеров сыворотки крови и/или визуализацию in vivo. Согласно некоторым вариантам осуществления этап выбора (i) включает методику визуализации in vivo, как описано в настоящем документе.

[815] Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние, связанное с TGFβ1, представляет собой фиброзное состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления этап выбора (i) включает обнаружение клеток-миофибробластов или одного или нескольких их маркеров. Согласно некоторым вариантам осуществления этап выбора (i) включает обнаружение стеатоза печени, триглицеридов печени, иммунных клеток и/или миофибробластов. Согласно некоторым вариантам осуществления обнаружение включает анализ биоптата, анализ маркеров сыворотки крови и/или визуализацию in vivo. Согласно некоторым вариантам осуществления визуализация in vivo включает ультразвуковое исследование, ультразвуковую эластографию, визуализацию CT, MRI, PET-SPECT, оптическую флуоресценцию/биолюминесценцию FibroScan (TE), pSWE, 2D-3D SWE, MRE, ультрасонографию, CAP, MRI-PDFF и/или MRS. Согласно некоторым вариантам осуществления визуализация in vivo включает прямое или непрямое мечение иммунных клеток или антител, которые связывают маркер иммунных клеток на клеточной поверхности. Согласно некоторым вариантам осуществления визуализация in vivo включает использование индикатора.

[816] Согласно некоторым вариантам осуществления методика визуализации in vivo позволяет измерять стеатоз печени, триглицериды печени, иммунные клетки (например, как описано ниже) и/или миофибробласты. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение снижает уровень триглицеридов, стеатоз, узелки на поверхности печени, воспаление и/или макрофаги в пораженной ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение снижает содержание внутрипеченочных триглицеридов до $\leq 5,5\%$. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение снижает количество MDSC в пораженной ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение снижает количество макрофагов в пораженной ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество составляет от 0,1 мг/кг до 30 мг/кг, необязательно от 3 мг/кг до 30 мг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает мониторинг субъекта в отношении терапевтического ответа, как описано в настоящем документе (например, снижение уровня триглицеридов, снижение стеатоза, уменьшение узелков на поверхности печени, уменьшение воспаления, уменьшение количества макрофагов и/или снижение показателя печени).

[817] Настоящее изобретение также предусматривает способ лечения рака, который может предусматривать следующие этапы: i) выбор пациента, которому поставлен диагноз рака, содержащего солидную опухоль, при этом солидная опухоль является или предположительно является иммунно-исключенной опухолью; и, ii) введение пациенту антитела или фрагмента, охваченного настоящим документом, в количестве, эффективном для лечения рака. Предпочтительно, пациент получал или является кандидатом на получение терапии рака, такой как различные виды терапии ингибированием иммунных контрольных точек (например, антитела PD-(L)1), различные виды химиотерапии, различные виды лучевой терапии, различные виды терапии модифицированными иммунными клетками и различные виды терапии противораковыми вакцинами. Согласно некоторым вариантам осуществления этап выбора (i) включает обнаружение иммунных клеток или одного или нескольких их маркеров, при этом необязательно обнаружение включает анализ биоптата опухоли, анализ маркеров сыворотки крови и/или визуализацию in vivo. Согласно некоторым вариантам осуществления этап выбора (i) включает методику визуализации in vivo, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает мониторинг терапевтического ответа, как описано в настоящем документе.

[818] Согласно некоторым вариантам осуществления визуализацию in vivo выполняют для мониторинга терапевтического ответа на терапию ингибированием TGFβ1 у субъекта. Визуализация in vivo может включать любую из методик визуализации, описанных в настоящем документе, и измерять любой из маркеров и/или параметров, описанных в настоящем документе. Например, в случае фиброза печени терапевтический ответ может включать уменьшение стеатоза печени, снижение содержания триглицеридов, снижение отложения/фиброза ECM, снижение цирроза и/или замедление прогрессирования заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение специфическим в отношении изоформы ингибитором TGFB1, как описано в настоящем документе, снижает внутрипеченочное содержание триглицеридов до уровней $\leq 5{,}5\%$, как измерено с помощью MRI. В случае рака терапевтический ответ может включать превращение иммунно-исключенной опухоли в воспаленную опухоль (что коррелирует с повышенной инфильтрацией иммунных клеток в опухоль), уменьшение размера опухоли и/или замедление прогрессирования заболевания. Повышенная инфильтрация иммунных клеток может быть визуализирована по увеличению частоты внутриопухолевых иммунных клеток или степени обнаружения сигналов, таких как радиоактивная метка и флуоресценция.

[819] Согласно некоторым вариантам осуществления визуализация in vivo, используемая для диагностики, выбора, лечения или мониторинга пациентов, включает

отслеживание MDSC, таких как G-MDSC (также известных как PMN-MDSC) и M-MDSC. Например, MDSC могут быть обогащены в очаге заболевания (таком как фиброзные ткани и солидные опухоли) на исходном уровне. После терапии (например, терапии ингибитором TGFβ1) может наблюдаться меньшее количество MDSC, что измеряется по уменьшенной интенсивности метки (такой как радиоизотоп и флуоресценция), что свидетельствует о терапевтических эффектах.

[820] Согласно некоторым вариантам осуществления визуализация in vivo включает отслеживание или локализацию LRRC33-положительных клеток. LRRC33-положительные клетки включают, например, MDSC и активированные M2-подобные макрофаги (например, TAM и активированные макрофаги, ассоциированные с фиброзными тканями). Например, LRRC33-положительные клетки могут быть обогащены в очаге заболевания (таком как фиброзные ткани и солидные опухоли) на исходном уровне. После терапии (например, терапии ингибитором TGFβ1) может наблюдаться меньшее количество клеток, экспрессирующих LRRC33 на клеточной поверхности, что измеряется по уменьшенной интенсивности метки (такой как радиоизотоп и флуоресценция), что свидетельствует о терапевтических эффектах.

[821] Согласно некоторым вариантам осуществления методики визуализации in vivo, описанные в настоящем документе, могут включать использование PET-SPECT, MRI и/или оптической флуоресценции/биолюминесценции для обнаружения клеток, представляющих интерес.

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

[823] Согласно некоторым вариантам осуществления детектирующий фрагмент может представлять собой индикатор. Согласно некоторым вариантам осуществления индикатор может представлять собой радиоизотоп, при этом необязательно радиоизотоп может представлять собой изотоп, излучающий позитроны. Согласно некоторым вариантам осуществления радиоизотоп выбирают из группы, состоящей из: 18F, 11C, 13N, 15O, 68Ga, 177Lu, 18F и 89Zr.

[824] Таким образом, такие способы можно применять для осуществления визуализации in vivo с использованием меченых антител в иммунной PET.

[825] Соответственно, настоящее изобретение также предусматривает способ лечения показания, связанногос TGFβ1, у субъекта, который включает этап диагностики, выбора пациента и/или мониторинга терапевтических эффектов, в котором применяют методику визуализации. Согласно некоторым вариантам осуществления высокоаффинный

селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1 в соответствии с настоящим раскрытием используют в лечении показания, связанного с TGFβ1, при этом лечение включает введение эффективного количества ингибитора TGFβ1 для лечения показания, и дополнительно включает этап мониторинга терапевтических эффектов у субъекта с помощью визуализации in vivo. Необязательно субъект может быть выбран в качестве кандидата для получения терапии ингибитором TGFβ1 с использованием этапа диагностики или отбора, который включает визуализацию in vivo. Показанием, связанным с TGFβ1, может быть пролиферативное нарушение (например, рак с солидной опухолью и миелофиброз) или фиброзное нарушение (например, фиброз органов).

[826] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет рак, при этом способ включает следующие этапы: i) выбор пациента, которому поставлен диагноз рака, включающий солидную опухоль, при этом солидная опухоль представляет собой или предположительно является иммунно-исключенной опухолью; и, ii) введение пациенту антитела или фрагмента, охваченного настоящим документом, в количестве, эффективном для лечения рака. Предпочтительно, пациент получал или является кандидатом на получение терапии рака, такой как различные виды терапии ингибированием иммунных контрольных точек (например, антитела PD-(L)1), различные виды химиотерапии, различные виды лучевой терапии, различные виды терапии модифицированными иммунными клетками и различные виды терапии противораковыми вакцинами. Согласно некоторым вариантам осуществления этап выбора (i) включает обнаружение иммунных клеток или одного или нескольких их маркеров, при этом необязательно обнаружение включает анализ биоптата опухоли, анализ маркеров сыворотки крови и/или визуализацию in vivo. Согласно некоторым вариантам осуществления этап выбора (i) включает методику визуализации in vivo, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает мониторинг терапевтического ответа, как описано в настоящем документе.

Анализы для обнаружения больших латентных комплексов (LLC)

[827] Согласно некоторым вариантам осуществления способы и композиции, предусмотренные в настоящем документе, относятся к обнаружению комплекса GARP-TGFβ1, комплекса LTBP1-TGFβ1, комплекса LTBP3-TGFβ1 и/или комплекса LRRC33-TGFβ1 в образце, получаемом от субъекта. Как используется в настоящем документе, термин «субъект» относится к отдельному организму, например, отдельному млекопитающему. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является человек. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является отличное от

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

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

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

Клеточные анализы для изменения активации TGFβ

[830] Активацию TGFβ (и его ингибирование исследуемым ингибитором TGFβ, таким как антитело) можно измерить с помощью любого подходящего способа, известного в настоящей области техники. Например, активацию TGFβ, опосредованную интегрином, можно использовать в клеточном анализе активности, таком как анализ репортера «CAGA12» (например, люциферазы), более подробно описанный в настоящем документе. Как продемонстрировано, такая аналитическая система содержит следующие компоненты: i) источник TGFβ (рекомбинантный, эндогенный или трансфицированный); ii) источник

интегрина (рекомбинантный, эндогенный или трансфицированный); и iii) репортерную систему, которая отвечает на активацию TGFβ, такую как клетки, экспрессирующие рецепторы TGFβ, способные отвечать на TGFβ и транслирующие сигнал в считываемый результат (например, люциферазную активность в клетках CAGA12 или других репортерных клеточных линиях). Согласно некоторым вариантам осуществления репортерная клеточная линия содержит репортерный ген (например, ген люциферазы) под контролем TGFβ-восприимчивого промотора (например, промотора PAI-1). Согласно некоторым вариантам осуществления в репортерную систему можно включать определенные промоторные элементы, которые придают восприимчивость. Согласно некоторым вариантам осуществления таким промоторным элементом является элемент CAGA12. Репортерные клеточные линии, которые можно использовать в анализе, были описаны, например, в работе Abe et al. (1994) Anal Biochem. 216(2): 276-84, включенной в настоящий документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам осуществления каждый из вышеупомянутых аналитических компонентов происходят из одного и того же источника (например, одной и той же клетки). Согласно некоторым вариантам осуществления два из вышеупомянутых аналитических компонента получают из одного и того же источника, и третий аналитический компонент получают из другого источника. Согласно некоторым вариантам осуществления все три аналитических компонента получают из различных источников. Например, согласно некоторым вариантам осуществления интегрин и комплекс латентного TGFβ (proTGFβ и презентирующая молекула) получают для анализа из одного и того же источника (например, одной и той же трансфицированной клеточной линии). Согласно некоторым вариантам осуществления интегрин и TGF получают для анализа из отдельных источников (например, двух различных клеточных линий, комбинации очищенного интегрина и трансфицированной клетки). В случае, если клетки применяют в качестве источника одного или нескольких аналитических компонентов, такие компоненты анализа могут быть эндогенными в отношении клетки, стабильно экспрессируемыми в клетке, временно трансфицированными или любой их комбинацией.

[831] Специалист в настоящей области техники легко адаптирует такие анализы к различным подходящим конфигурациям. Например, можно рассматривать ряд источников TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления источником TGFβ является клетка, которая экспрессирует и откладывает TGFβ (например, первичная клетка, делящаяся клетка, иммортализованная клетка или клеточная линия и т.д.). Согласно некоторым вариантам осуществления источником TGFβ является очищенный и/или рекомбинантный TGFβ, иммобилизованный в аналитической системе с помощью подходящих средств.

Согласно некоторым вариантам осуществления иммобилизованный TGFβ в аналитической системе представлен в композиции внеклеточного матрикса (ECM) на аналитическом планшете, с децеллюляризацией или без таковой, которая имитирует происходящий из фибробластов TGFβ. Согласно некоторым вариантам осуществления TGFβ присутствует на клеточной поверхности клетки, используемой в анализе. Кроме того, предпочтительная презентирующая молекула может быть включена в аналитическую систему для обеспечения подходящего комплекса латентного TGFβ. Специалист в настоящей области техники легко определит, какая (какие) презентирующая (презентирующие) молекула (молекулы) может (могут) присутствовать или экспрессироваться в определенных клетках или типах клеток. С помощью таких аналитических систем можно легко измерить относительные изменения активации TGFβ в присутствии или отсутствии исследуемого средства (такого как антитела) в целях оценки эффектов исследуемого средства в отношении активации TGFβ in vitro. Данные на основе иллюстративных клеточных анализов представлены в разделе Примеры ниже.

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

можно детектировать с помощью планшет-ридера BioTek (Synergy H1), с настройками автоматического контроля усиления.

[833] Данные демонстрируют, что иллюстративные антитела по настоящему изобретению способны селективно ингибировать активацию TGFβ1 контекстно-независимым образом.

Нуклеиновые кислоты

[834] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, их антигенсвязывающие части и/или композиции по настоящему раскрытию можно кодировать молекулами нуклеиновых кислот. Такие молекулы нуклеиновых кислоты включают без ограничения молекулы ДНК, молекулы РНК, полинуклеотиды, олигонуклеотиды, молекулы мРНК, векторы, плазмиды и т.п. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие может предусматривать клетки, программируемые или генерируемые для экспрессии молекул нуклеиновых кислот, кодирующих соединения и/или композиции по настоящему раскрытию. В некоторых случаях нуклеиновые кислоты по настоящему раскрытию включают кодон-оптимизированные нуклеиновые кислоты. Способы получения кодон-оптимизированных нуклеиновых кислот известны в настоящей области техники и могут включать без ограничения таковые, описанные в патентах США №№ 5786464 и 6114148, содержание каждого из которых включено посредством ссылки в полном объеме.

Перечень определенных вариантов осуществления

[835] Неограничивающие варианты осуществления настоящего раскрытия перечислены ниже:

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают каждый из следующих антигенных комплексов с KD, составляющей ≤ 10 нМ, необязательно ≤ 5 нМ, как измерено с помощью анализа на основе титрования равновесного раствора:

i) hLTBP1-proTGFβ1;

ii) hLTBP3-proTGFβ1;

iii) hGARP-proTGFβ1; и,

iv) hLRRC33-proTGFβ1;

причем антитело или его фрагмент представляет собой полностью человеческое или гуманизированное антитело или его фрагмент.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 1, которые связывают каждый из комплексов i) hLTBP1-proTGFβ1 и ii) hLTBP3-proTGFβ1 с KD, составляющей ≤ 5 нМ, как измерено с помощью анализа на основе титрования равновесного раствора, причем необязательно антитело или фрагмент связывает каждый из комплексов с KD, составляющей ≤ 1 нМ, как измерено с помощью анализа на основе титрования равновесного раствора.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают каждый из следующих антигенных комплексов с KD, составляющей ≤ 200 пМ, необязательно ≤ 100 пМ, как измерено с помощью анализа на основе титрования равновесного раствора:

i) hLTBP1-proTGFβ1;

ii) hLTBP3-proTGFβ1;

iii) hGARP-proTGFβ1; и

iv) hLRRC33-proTGFβ1;

причем антитело или его фрагмент представляет собой полностью человеческое или гуманизированное антитело или его фрагмент.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, которые содержат CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

CDR-H1 характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной FTF(X_1)(X_2)(X_3)(X_4)M(X_5), где необязательно, X_1 представляет собой S, G или A; X_2 представляет собой S или F; X_3 представляет собой F или Y; X_4 представляет собой S или A; и/или X_5 представляет собой D, N или Y (SEQ ID NO: 143);

CDR-H2 характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной YI(X_1)(X_2)(X_3)A(X_4)TIYYA(X_5)SVKG, где необязательно, X_1 представляет собой S или H; X_2 представляет собой P или S; X_3 представляет собой S или D; X_4 представляет собой D или S; и/или X_5 представляет собой D или G (SEQ ID NO: 144);

CDR-H3 характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной (X_1)R(X_2)(X_3)(X_4)D(X_5)GDML(X_6)P, где необязательно, X_1 представляет собой или V; X_2 представляет собой G или A; X_3 представляет собой V или T; X_4 представляет собой L или W; X_5 представляет собой Y или M; и/или X_6 представляет собой M или D (SEQ ID NO: 145);

CDR-L1 характеризуется аминокислотной последовательностью QASQDITNYLN (SEQ ID NO: 105), с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами;

CDR-L2 характеризуется аминокислотной последовательностью DASNLET (SEQ ID NO: 106), с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами; и,

CDR-L3 характеризуется аминокислотной последовательностью QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12), с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, которые содержат CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

CDR-H1 характеризуется аминокислотной последовательностью FTFSSFSMD (SEQ ID NO: 107), с необязательно вплоть до 4 аминокислотными заменами или вплоть до 2 аминокислотными заменами;

CDR-H2 характеризуется аминокислотной последовательностью YISPSADTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 103), с необязательно вплоть до 4 аминокислотными заменами;

CDR-H3 характеризуется аминокислотной последовательностью ARGVLDYGDMLMP (SEQ ID NO: 6), с необязательно вплоть до 3 аминокислотными заменами;

CDR-L1 характеризуется аминокислотной последовательностью QASQDITNYLN (SEQ ID NO: 105), с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами;

CDR-L2 характеризуется аминокислотной последовательностью DASNLET (SEQ ID NO: 106), с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами; и,

CDR-L3 характеризуется аминокислотной последовательностью QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12), с необязательно 1 или 2 аминокислотными заменами.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления,

где CDR-H1 содержит GFTFSSFS (SEQ ID NO: 2); CDR-H2 содержит ISPSADTI (SEQ ID NO: 4); CDR-H3 содержит ARGVLDYGDMLMP (SEQ ID NO: 6); CDR-L1 содержит QDITNY (SEQ ID NO: 8); CDR-L2 содержит DAS (SEQ ID NO: 10); и, CDR-L3 содержит QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12).

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, которые связывают эпитоп, который включает в

себя один или несколько аминокислотных остатков лассо латентности, причем необязательно эпитоп представляет собой комбинаторный эпитоп, причем дополнительно необязательно комбинаторный эпитоп содержит один или несколько аминокислотных остатков Finger-1 и/или Finger-2 домена фактора роста.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 7, причем эпитоп содержит один или несколько аминокислотных остатков из KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL (SEQ ID NO: 169), и при этом необязательно эпитоп дополнительно содержит один или несколько аминокислотных остатков из RKDLGWKWIHEPKGYHANF (SEQ ID NO: 165) и/или VGRKPKVEQL (SEQ ID NO: 168).

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 8, причем эпитоп содержит один или несколько аминокислотных остатков из KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL (SEQ ID NO: 169), и один или несколько аминокислотных остатков из RKDLGWKWIHEPKGYHANF (SEQ ID NO: 165).

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 8, причем эпитоп содержит один или несколько аминокислотных остатков из KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL (SEQ ID NO: 169) и один или несколько аминокислотных остатков из VGRKPKVEQL (SEQ ID NO: 168).

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 7, причем эпитоп содержит один или несколько аминокислотных остатков из KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL (SEQ ID NO: 169), один или несколько аминокислотных остатков из RKDLGWKWIHEPKGYHANF (SEQ ID NO: 165) и один или несколько аминокислотных остатков из VGRKPKVEQL (SEQ ID NO: 168).

12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полностью человеческое или гуманизированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент перекрестно реагирует с комплексами proTGFβ1 человека и мыши.

14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой подтип IgG4 или IgG1 человека.

15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит замену в основной цепи Ser на Pro, которая дает в результате IgG1-подобный шарнир.

16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, которые характеризуются IC50, составляющей ≤ 2 нМ по отношению к каждому из следующих комплексов, как измерено с помощью клеточного репортерного анализа.

i) hLTBP1-proTGFβ1;

ii) hLTBP3-proTGFβ1;

iii) hGARP-proTGFβ1; и

iv) hLRRC33-proTGFβ1.

17. Выделенное моноклональное антитело или его фрагмент, которые специфически связывают каждый из следующих антигенов с аффинностью, составляющей ≤ 1 нМ, как измерено с помощью биослойной интерферометрии или поверхностного плазмонного резонанса:

a) комплекс LTBP1-proTGFβ1 человека;

b) комплекс LTBP3-proTGFβ1 человека;

c) комплекс GARP-proTGFβ1 человека; и

d) комплекс LRRC33-proTGFβ1 человека;

причем моноклональное антитело показывает не более чем трехкратное смещение в аффинности по отношению к любому из вышеуказанных комплексов по сравнению с другими комплексами, и

причем моноклональное антитело ингибирует высвобождение зрелого фактора роста TGFβ1 из каждого из комплексов proTGFβ1, но не из комплексов proTGFβ2 или proTGFβ3.

18. Выделенное моноклональное антитело или его фрагмент, которые специфически связывают комплекс proTGFβ1 в области связывания, характеризующейся аминокислотной последовательностью PGPLPEAV (SEQ ID NO: 161) или ее частью,

отличающиеся тем, что при связывании с комплексом proTGFβ1 в растворе антитело или фрагмент защищает область связывания от воздействия растворителя, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS); и

причем антитело или фрагмент специфически связывает каждый из следующих комплексов: LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1, с аффинностью, составляющей ≤ 5 нМ, как измерено с помощью биослойной интерферометрии или поверхностного плазмонного резонанса.

19. Выделенное моноклональное антитело или его фрагмент, которые специфически связывают комплекс proTGFβ1 в области связывания, характеризующейся аминокислотной последовательностью LVKRKRIEA (SEQ ID NO: 159) или ее частью,

отличающиеся тем, что при связывании с комплексом proTGFβ1 в растворе антитело или фрагмент защищает область связывания от воздействия растворителя, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS); и

причем антитело или фрагмент специфически связывает каждый из следующих комплексов: LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1, с аффинностью, составляющей ≤ 5 нМ, как измерено с помощью биослойной интерферометрии или поверхностного плазмонного резонанса.

20. Выделенное моноклональное антитело или его фрагмент, которые специфически связывают комплекс proTGFβ1 в

i) первой области связывания, содержащей по меньшей мере часть лассо латентности (SEQ ID NO: 153); и

ii) второй области связывания, содержащей по меньшей мере часть Finger-1 (SEQ ID NO: 151);

отличающиеся тем, что при связывании с комплексом proTGFβ1 в растворе антитело или фрагмент защищает область связывания от воздействия растворителя, как определено с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS).

21. Антитело или фрагмент по п. 45, причем первая область связывания содержит PGPLPEAV (SEQ ID NO: 161) или ее часть, и вторая область связывания содержит RKDLGWKW (SEQ ID NO: 170) или ее часть.

22. Антитело или фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело представляет собой контекстно-независимое антитело, так что оно связывает ассоциированные с матриксом комплексы proTGFβ1 и ассоциированные с клетками комплексы proTGFb1 с менее чем пятикратным смещением в аффинности, как измерено с помощью биослойной интерферометрии или поверхностного плазмонного резонанса.

23. Антитело или фрагмент по любому из пп. 43-47, которые специфически связывают каждый из следующих комплексов: mLTBP1-proTGFβ1, mLTBP3-proTGFβ1, mGARP-proTGFβ1 и mLRRC33-proTGFβ1, с аффинностью, составляющей ≤ 1 нМ.

24. Антитело или фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, которые связывают комплекс proTGFβ1 в одной или нескольких из следующих областей связывания или их части:

LVKRKRIEA (SEQ ID NO: 159);

LASPPSQGEVPPGPL (SEQ ID NO: 153);

PGPLPEAV (SEQ ID NO: 161);

LALYNSTR (SEQ ID NO: 162);

REAVPEPVL (SEQ ID NO: 163);

YQKYSNNSWR (SEQ ID NO: 164);

RKDLGWKWIHE (SEQ ID NO: 171);

HEPKGYHANF (SEQ ID NO: 172);

LGPCPYIWS (SEQ ID NO: 166);

ALEPLPIV (SEQ ID NO: 167); и,

VGRKPKVEQL (SEQ ID NO: 168).

25. Антитело или фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, характеризующиеся последовательностью CDR, выбранной из группы, состоящей из:

GFTFSSFS (SEQ ID NO: 2)

ISPSADTI (SEQ ID NO: 4)

ARGVLDYGDMLMP (SEQ ID NO: 6)

QDITNY (SEQ ID NO: 8)

DAS и (SEQ ID NO: 10)

QQADNHPPWT (SEQ ID NO: 12).

26. Антитело согласно варианту осуществления 25, которое содержит все из CDR.

27. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают каждый из следующих антигенов:

hLTBP1-proTGFβ1

hLTBP3-proTGFβ1

hGARP-proTGFβ1; и

hLRRC33-proTGFβ1;

причем антитело или фрагмент связывает каждый из hLTBP1-proTGFβ1 и hLTBP3-proTGFβ1 с KD, составляющей ≤ 1 нМ, как измерено с помощью анализа на основе титрования равновесного раствора;

причем антитело или фрагмент связывает эпитоп, содержащий один или несколько аминокислотных остатков из LRLASPPSQGEVPPGPLPEAV (SEQ ID NO: 173), и необязательно эпитоп дополнительно содержит один или несколько аминокислотных остатков из RKDLGWKWIHEPKGYHANF (SEQ ID NO: 165).

28. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления,

причем антитело или фрагмент связывает каждый из LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ1 с аффинностью, составляющей ≤ 1 нМ; и

причем антитело или фрагмент связывает ассоциированные с матриксом комплексы proTGFβ1 с по меньшей мере в 10 раз более высокими аффинностями, чем ассоциированные с клетками комплексы proTGFβ1.

29. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно предыдущему варианту осуществления, причем IC_{50} составляет ≤ 5 нМ, где необязательно IC_{50} составляет ≤ 1 нМ.

30. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны ингибировать интегрин-зависимую активацию TGFβ1.

31. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны ингибировать протеазозависимую активацию TGFβ1.

32. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны ингибировать интегрин-зависимую активацию TGFβ1 и протеазозависимую активацию TGFβ1.

33. Антитело или его фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, которые не связывают специфически proTGFβ2 или proTGFβ3.

34. Антитело или его фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, которые не связывают специфически свободный фактор роста TGFβ1, который не ассоциирован с комплексом proTGFβ1.

35. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые перекрестно блокируются с антителом или фрагментом согласно любому из предыдущих вариантов осуществления.

36. Набор, содержащий антитело или фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления.

37. Композиция, содержащая антитело или фрагмент согласно любому из предыдущих вариантов осуществления и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

38. Композиция согласно варианту осуществления 37 для применения в терапии при лечении связанного с TGFβ показания у субъекта.

39. Композиция для применения согласно варианту осуществления 38, причем связанное с TGFβ показание представляет собой рак, миелофиброз, нарушение стволовых клеток и/или фиброзное нарушение.

40. Композиция для применения согласно варианту осуществления 38, причем связанное с TGFβ показание выбрано из следующего:

i) заболевание, при котором TGFβ1 избыточно экспрессируется или нарушается регуляция передачи сигналов TGFβ1;

ii) заболевание, ассоциированное с аномальной дифференцировкой или репопуляцией стволовых клеток, причем необязательно:

a) дифференцировка/восстановление стволовых клеток/клеток-предшественников остановлена или нарушена из-за заболевания или вызвана как побочный эффект терапии/опосредования;

b) пациенты проходят терапию или опосредование, которые вызывают гибель или истощение здоровых клеток;

c) пациенты могут получить положительный эффект от увеличения дифференцировки/восстановления стволовых клеток/клеток-предшественников;

d) заболевание ассоциировано с аномальной дифференцировкой или восстановлением стволовых клеток

iii) состояния, характеризующиеся дисрегуляцией кроветворения, таким как дисрегуляция кроветворения, вызванное лечением;

iv) заболевания с аберрантной генной экспрессией одного или нескольких генов, выбранных из группы, состоящей из следующего:

серпин 1 (кодирующий PAI-1), MCP-1 (также известный как CCL2), CCL3, Col1a1, Col3a1, FN1, TGFB1, CTGF, ACTA2 (кодирующий α-SMA), ITGA11, SNAI1, MMP2, MMP9, TIMP1, FOXP3, CDH1 (E-кадгерин) и CDH2;

v) заболевания, связанные с протеазами;

vi) заболевания, характеризующиеся мезенхимальным переходом, таким как эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) и/или эндотелиально-мезенхимальный переход (EndMT);

vii) заболевания, характеризующиеся иммуносупрессией, при этом необязательно иммуносупрессия включает в себя увеличение количества иммуносупрессивных клеток в очаге заболевания, причем дополнительно необязательно иммуносупрессивные клетки представляют собой макрофаги M2 и/или MDSC;

viii) заболевания, характеризующиеся повышением жесткости и ремоделированием матрикса; необязательно включая в себя жесткость ECM;

ix) фиброз органов, необязательно распространенный фиброз органов;

x) первичный и вторичный миелофиброз;

xi) злокачественные новообразования/рак

a) солидная опухоль, необязательно распространенная солидная опухоль или метастатическая опухоль;

b) рак крови.

41. Композиция для применения согласно варианту осуществления 40, причем рак содержит солидную опухоль или причем рак представляет собой рак крови.

42. Композиция для применения согласно варианту осуществления 41, причем солидная опухоль плохо отвечает на терапию рака, причем необязательно терапия рака представляет собой терапию ингибитором контрольной точки, противораковую вакцину, химиотерапию, лучевую терапию, онколитическую вирусную терапию, терапию ингибитором IDO и/или терапия на основе сконструированных иммунных клеток.

43. Композиция для применения согласно варианту осуществления 41, причем солидная опухоль представляет собой опухоль с иммунным исключением.

44. Композиция для применения согласно варианту осуществления 41, причем солидная опухоль содержит Treg, внутриопухолевые макрофаги M2 и/или MDSC.

45. Композиция для применения согласно варианту осуществления 41, причем солидная опухоль содержит строму, обогащенную CAF и/или миофибробластами.

46. Композиция для применения согласно варианту осуществления 41, причем субъект получает или является кандидатом на получение терапии рака, выбранной из группы, состоящей из: химиотерапии, лучевой терапии, CAR-T, противораковой вакцины, онколитической вирусной терапии и терапии ингибиторами контрольных точек.

47. Композиция для применения согласно варианту осуществления 41, причем рак характеризуется приобретенной устойчивостью или первичной устойчивостью к терапии рака.

48. Композиция для применения согласно любому варианту осуществления 38-47, причем лечение рака предусматривает введение терапевтически эффективного количества композиции для уменьшения роста солидной опухоли, причем необязательно введение композиции увеличивает выживаемость.

49. Композиция для применения согласно любому варианту осуществления 38-48, причем лечение предусматривает введение композиции в дозе в диапазоне, составляющем 1-30 мг/кг.

50. Способ выбора субъекта, который, вероятно, будет отвечать на терапию ингибированием TGFβ1, предусматривающий следующую стадию:

идентификация субъекта, у которого диагностирован рак, причем: i) рак представляет собой тип рака, о котором известно, что он подвержен устойчивости к терапии рака, и/или ii) субъект является устойчивым к терапии рака, при этом необязательно субъект является неответившим на первичную терапию рака;

причем терапия рака необязательно представляет собой химиотерапию, лучевую терапию и/или терапию ингибированием иммунных контрольных точек; и

выбор субъекта в качестве кандидата на терапию ингибированием TGFβ1.

51. Способ лечения рака, причем способ предусматривает стадии:

i) выбор пациента, у которого диагностирован рак, содержащий солидную опухоль, при этом солидная опухоль является или предположительно является опухолью с иммунным исключением;

ii) введение пациенту антитела или фрагмента по любому из пп. 1-10 в количестве, эффективном для лечения рака,

причем (a) пациент получил или является кандидатом на получение терапии рака, выбранной из группы, состоящей из: терапии ингибированием иммунных контрольных точек (CBT), химиотерапии, лучевой терапии, терапии на основе сконструированных иммунных клеток и терапии противораковой вакциной; или (b) пациента характеризуется наличием рака со статистически низкими показателями первичного ответа, и при этом пациент не получал CBT.

52. Способ по п. 25, при котором ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1.

53. Способ по п. 26, при котором стадия выбора (i) предусматривает обнаружение иммунных клеток или одного или нескольких их маркеров.

54. Способ по п. 27, при котором обнаружение предусматривает анализ биопсии опухоли, анализ маркеров сыворотки и/или визуализацию in vivo.

55. Способ по п. 27 или 28, при котором иммунные клетки выбраны из группы, состоящей из: цитотоксических Т-лимфоцитов, регуляторных Т-клеток, MDSC, ассоциированных с опухолью макрофагов, NK-клеток, дендритных клеток и нейтрофилов.

56. Способ по любому из пп. 27-29, при котором маркер иммунных клеток выбран из группы, состоящей из: CD8, CD3, CD4, CD11b, CD163, CD68, CD14, CD34, CD25, CD47.

57. Способ по п. 28, при котором визуализация in vivo включает в себя отслеживание Т-клеток.

58. Способ по п. 28 или 31, при котором визуализация in vivo включает в себя использование ПЭТ-ОФЭКТ, МРТ и/или оптической флуоресценции/биолюминесценции.

59. Способ по п. 31 или 32, при котором визуализация in vivo включает в себя прямое или непрямое мечение иммунных клеток или антитело, которое связывается с маркером клеточной поверхности иммунных клеток.

60. Способ по любому из пп. 28-33, при котором визуализация in vivo включает в себя использование индикатора.

61. Способ по п. 34, при котором индикатор представляет собой радиоактивный изотоп.

62. Способ по п. 35, при котором радиоактивный изотоп представляет собой позитронно-активный изотоп.

63. Способ по п. 36, при котором радиоактивный изотоп выбран из группы, состоящей из: ^{18}F, ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{68}Ga, ^{177}Lu, ^{18}F и ^{89}Zr.

64. Способ по любому из пп. 28-37, при котором визуализация in vivo включает в себя использование меченых антител в иммуно-ПЭТ.

65. Способ по любому из пп. 28-38, при котором визуализацию in vivo выполняют для мониторинга терапевтического ответа на терапию ингибированием TGFβ1 у субъекта.

66. Способ по п. 39, при котором терапевтический ответ содержит преобразование опухоли с иммунным исключением в воспаленную опухоль.

67. Способ идентификации селективного в отношении изоформы ингибитора активации TGFβ1 для терапевтического применения, причем способ предусматривает следующие стадии:

i) выбор пула антител или антигенсвязывающих фрагментов, способных связывать каждый из: hLTBP1-proTGFβ1; hLTBP3-proTGFβ1; hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1 in vitro с KD, составляющей ≤ 10 нМ, как измерено с помощью анализа на основе титрования равновесного раствора;

ii) выбор пула антител или антигенсвязывающих фрагментов, способных ингибировать активацию TGFβ, необязательно в клеточном анализе;

iii) испытание одного или нескольких антител или их антигенсвязывающих фрагментов из стадий i) и ii) в исследовании эффективности in vivo;

iv) испытание одного или нескольких антител или их антигенсвязывающих фрагментов из стадий i) - iii) в исследовании токсикологии/безопасности in vivo; и

v) идентификация одного или нескольких антител или их антигенсвязывающих фрагментов из стадий i) - iv), где антитела или фрагменты демонстрируют эффективные дозы, определенные в исследовании эффективности in vivo, которые ниже NOAEL, определенного в исследовании токсикологии/безопасности in vivo.

68. Применение антитела или фрагмента согласно любым вариантам осуществления 1-35 при производстве лекарственного средства для лечения показания, связанного с TGFβ1.

69. Применение согласно варианту осуществления 68, дополнительно предусматривающее стадию стерильной фильтрации состава, содержащего антитело или фрагмент.

70. Применение согласно варианту осуществления 68 или 69, дополнительно предусматривающее стадию наполнения и/или упаковки во флакон или шприц.

71. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1, причем способ предусматривает следующее:

i) получение антитела, способного связывать каждый из hLTBP1-proTGFβ1, hLTBP3-proTGFβ1, hGARP-proTGFβ1 и hLRRC33-proTGFβ1 с KD, составляющей 1 нМ или меньше,

ii) проведение исследования эффективности in vivo, при котором антитело из стадии (i) вводят в доклиническую модель для определения эффективных количеств,

iii) проведение токсикологического исследования с использованием модели на животных, которая, как известно, чувствительна к ингибированию TGFβ, для определения количеств, при которых наблюдаются нежелательные токсические эффекты;

iv) определение или подтверждение достаточного терапевтического окна на основе стадий (ii) и (iii); и

v) производство фармацевтической композиции, содержащей антитело.

72. Способ производства антитела или фрагмента согласно любым вариантам осуществления 1-35, причем способ предусматривает следующие стадии:

i) получение антигена, который содержит комплекс proTGFβ1, необязательно содержащий по меньшей мере два из: LTBP1, LTBP3, GARP, LRRC33 или его фрагмента,

ii) выбор пула антител или фрагментов по способности связывать антиген согласно стадии (i);

iii) необязательно удаление антител или фрагментов из пула, которые показывают нежелательные профили связывания;

iv) выбор пула антител или фрагментов, выбранных на стадии(ях) (ii) и/или (iii) по способности ингибировать TGFβ1;

v) необязательно получение полностью человеческого или гуманизированного антитела или фрагмента антитела, антител или фрагментов, выбранных на стадии (iv), так чтобы обеспечить человеческий или гуманизированный ингибитор;

vi) проведение анализа связывания in vitro для определения аффинностей в отношении LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1,

vii) проведение функционального анализа для определения или подтверждения активности ингибитора в отношении TGFβ1 и необязательно TGFβ2 и/или TGFβ3.

73. Способ согласно варианту осуществления 72, дополнительно предусматривающий стадию оценки антитела-кандидата или его фрагмента в исследовании

эффективности in vivo и токсикологическом исследовании in vivo на доклинической модели на животных, тем самым определяя эффективные количества, которые являются одновременно эффективными и безопасными или переносимыми.

74. Способ согласно варианту осуществления 72 или 73, дополнительно предусматривающий стадию составления в виде фармацевтической композиции.

75. Композиция согласно варианту осуществления 74 для терапевтического применения при лечении фиброза у субъекта-человека.

76. Композиция согласно варианту осуществления 74 для терапевтического применения при лечении миелофиброза у субъекта-человека.

77. Композиция согласно варианту осуществления 74 для терапевтического применения при лечении рака у субъекта-человека.

78. Композиция для применения согласно варианту осуществления 77, причем рак содержит солидную опухоль.

79. Композиция для применения согласно варианту осуществления 78, причем солидная опухоль представляет собой местнораспространенную солидную опухоль.

80. Композиция для применения согласно любым вариантам осуществления 77-79, причем рак плохо отвечает на терапию рака, причем необязательно терапия рака представляет собой терапию ингибитором контрольной точки, противораковую вакцину, химиотерапию, лучевую терапию, терапию ингибитором IDO и/или терапию на основе сконструированных иммунных клеток.

81. Композиция для применения согласно варианту осуществления 80, причем рак характеризуется приобретенной устойчивостью или первичной устойчивостью.

82. Композиция для применения согласно варианту осуществления 81, причем опухоль характеризуется иммунным исключением.

83. Композиция для применения согласно любым вариантам осуществления 78-82, причем опухоль содержит внутриопухолевые макрофаги M2 и/или MDSC.

84. Композиция для применения согласно любым вариантам осуществления 78-82, причем опухоль содержит строму, обогащенную CAF.

85. Композиция для применения согласно варианту осуществления 80, причем субъект получает или является кандидатом на получение терапии рака, выбранной из группы, состоящей из: химиотерапии, лучевой терапии, CAR-T, противораковой вакцины, онколитической вирусной терапии и терапии ингибиторами контрольных точек.

86. Композиция для применения согласно любым вариантам осуществления, причем субъекта дополнительно лечат с помощью ингибитора TGFβ3.

87. Композиция для применения согласно варианту осуществления 70, причем субъект характеризуется наличием TGFβ1-положительного и TGFβ3- положительного рака и при этом субъект получал, получает или является кандидатом на получение терапии ингибиторами контрольных точек.

88. Композиция для применения согласно любым вариантам осуществления 77-84, причем субъект не является кандидатом на хирургическую резекцию опухоли.

89. Композиция согласно варианту осуществления 37 для применения в усилении иммунитета хозяина у субъекта-человека,

причем субъект характеризуется наличием рака, и

причем иммунные ответы содержат противораковый иммунитет.

90. Композиция для применения согласно варианту осуществления 89, причем усиление иммунитета хозяина включает в себя снижение иммунного исключения в отношении опухоли или стимулирование инфильтратов иммунных клеток в опухоль.

91. Композиция для применения согласно варианту осуществления 89, причем усиление иммунитета хозяина включает в себя ингибирование плазмин-зависимой активации TGFβ1.

92. Композиция для применения согласно варианту осуществления 37, причем субъект подвержен риску развития цитокинового шторма.

93. Композиция для применения согласно варианту осуществления 37, причем субъект получает или является кандидатом на получение терапии на основе сконструированных иммунных клеток.

94. Композиция для применения согласно варианту осуществления 37, причем субъект получает или является кандидатом на получение противораковой вакцины.

95. Композиция для применения согласно любым вариантам осуществления 76-94, причем субъект получает или является кандидатом на получение терапии ингибитором иммунной контрольной точки, причем необязательно субъект плохо отвечает на терапию ингибитором иммунной контрольной точки.

96. Композиция согласно варианту осуществления 37 для применения при профилактике синдрома высвобождения цитокинов (например, цитокинового шторма или сепсиса) у субъекта-человека, причем субъект необязательно страдает инфекцией или рассеянным склерозом.

97. Композиция по п. 37 для применения в способе ингибирования плазмин-зависимой активации TGFβ1 у субъекта.

98. Способ лечения связанного с TGFβ1 показания у субъекта, причем способ предусматривает стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества селективного в отношении изоформы ингибитора TGFβ1 для лечения показания, причем селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1 представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывает каждый из hLTBP1-proTGFβ1; hLTBP3-proTGFβ1; hGARP-proTGFβ1; и hLRRC33-proTGFβ1 с KD, составляющей ≤ 10 нМ, как измерено с помощью титрования равновесного раствора.

99. Способ согласно варианту осуществления 98, при котором антитело связывает каждый из hLTBP1-proTGFβ1 и hLTBP3-proTGFβ1 с KD, составляющей ≤ 1 нМ, как измерено с помощью титрования равновесного раствора, причем необязательно

антитело связывает каждый из комплексов hLTBP1-proTGFβ1; hLTBP3-proTGFβ1; hGARP-proTGFβ1; и, hLRRC33-proTGFβ1 с KD, составляющей ≤ 1 нМ.

100. Способ согласно варианту осуществления 98 или 99, при котором антитело связывает лассо латентности или его часть.

101. Способ согласно варианту осуществления 100, при котором антитело дополнительно связывает Finger-1, Finger-2 или их часть(и).

102. Способ согласно любому из вариантов осуществления 98-101, при котором связанное с TGFβ1 показание представляет собой пролиферативное нарушение, выбранное из рака и миелопролиферативных нарушений.

103. Способ согласно варианту осуществления 102, при котором субъект плохо отвечает на терапию рака, причем терапия рака необязательно содержит терапию ингибированием контрольных точек, химиотерапию и/или лучевую терапию.

104. Способ согласно варианту осуществления 102, при котором субъекта дополнительно лечат с помощью терапии рака в сочетании с селективным в отношении изоформы ингибитором TGFβ1.

[836] Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Профили связывания in vitro

1) Анализ на основе BLI:

[837] Аффинность Ab4, Ab5, Ab6 и Ab3 измеряли с помощью анализа Octet® на человеческих клетках с proTGFβ1, в то время как активность измеряли с помощью репортерных клеток CAGA12, с исследованием ингибирования proTGFβ1 человека. Протокол, используемый для измерения аффинности антител к комплексам, представленным в настоящем документе, обобщен в таблице 19 ниже, а сводный список профилей аффинности иллюстративных антител по настоящему раскрытию представлен в таблице **8** в настоящем документе.

Таблица 19. Иллюстративный протокол выполнения анализа связывания Octet

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

[838] В качестве примера связывание Ab6 с антигенами TGFβ измеряли с помощью интерферометрии биослоя на FortéBio Octet Red384 с использованием полистирольных 96-луночных планшетов с черной половинной площадью (Greiner Bio-One). Связывание Ab6 со зрелыми факторами роста TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3 человека, а также с латентным TGFβ1

человека выполняли после связывания антигенов с аминореактивными биосенсорами второго поколения (AR2G) (FortéBio) с использованием аминореактивного набора реагентов (FortéBio) второго поколения (AR2G) в соответствии со спецификациями производителя. Биосенсорам AR2G сначала давали возможность гидратироваться в воде в автономном режиме в течение по меньшей мере 10 минут перед началом эксперимента. После начала эксперимента наконечники AR2G уравновешивали в воде в течение 1 минуты. Затем наконечники перемещали в свежеприготовленный активирующий раствор (18 частей воды, 1 часть 400 мМ EDC (1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида гидрохлорид) и 1 часть 200 мМ сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид)) в течение 5 минут. Рекомбинантный белок TGFβ (10 мкг/мл в 10 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5) связывали с активированными наконечниками в течение 3 минут перед гашением этаноламином, pH 8,5, в течение 15 минут. Исходный уровень определяли с помощью 20-минутной инкубации связанных наконечников в буфере EKB (буфер для кинетического анализа (FortéBio) с добавлением 2% BSA (Sigma), 0,5 M NaCl и 0,09% Tween-20 (Sigma). Затем кончикам позволяли ассоциироваться в растворе Ab6 с концентрацией 15 мкг/мл в EKB в течение 10 минут до 10 минут до диссоциации в EKB. Связывание Ab6 с большими латентными комплексами человека измеряли после иммобилизации Ab6 на поверхности биосенсоров с иммобилизованным антителом к Fc человека (FortéBio) (1 мкг/мл в EKB) в течение 5 минут. Затем определяли дополнительный 1-минутной исходный уровень перед ассоциацией LTBP1-proTGFβ1, LTBP1-proTGFβ2 или LTBP1-proTGFβ3 (100 нМ в EKB) в течение десяти минут. Наконец, была проведена десятиминутная диссоциация.

2) Анализ на основе титрования равновесного раствора:

[839] MSD-SET представляет собой хорошо изученную методику, которую можно применять для определения равновесной K_D раствор-фаза. Анализы при равновесии в растворе, такие как MSD-SET, основаны на принципе кинетического исключения, в котором связывание свободного лиганда в равновесии, а не скорость ассоциации и диссоциации в реальном времени измеряют для определения аффинности.

[840] Анализы MSD-SET выполняли для измерения аффинности антител при равновесии. Вкратце, каждое исследуемое антитело разводили в 3-5 раз и образцы смешивали с биотинилированным антигеном в 48-луночной планшете. Образцы SET уравновешивали в течение 20-24 часов при комнатной температуре. Между тем, планшет для захвата покрывали IgG (20 нМ) и инкубировали в течение ночи при 4 °C или 30 минут при комнатной температуре, после чего следовала стадия блокирования 5% BSA. После трехкратной промывки планшета для захвата добавляли образцы SET и инкубировали в течение 150 секунд. Планшет промывали один раз для удаления несвязавшихся комплексов.

Добавляли 250 нг/мл SA-Sulfotag, затем промывали 3 раза. Добавляли 2× буфер для считывания, и сигналы от меченых связанных комплексов считывали с использованием прибора QuickPlex™ SQ 120.

[841] Обобщенные перечни профилей аффинности иллюстративных антител по настоящему раскрытию, как измерено с помощью MSD-SET, представлены в таблице **9 и 10** в настоящем документе.

[842] Например, стандартные планшеты MSD (MSD) покрывали 20 нМ раствором моноклонального антитела в PBS в течение 30 минут при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °C. Затем возрастающие концентрации того же моноклонального антитела, используемого для покрытия, смешивали с биотинилированным антигеном (от 50 до 400 пМ для связывания с Ab6; от 0,8 до 1,6 нМ для связывания с Ab4) в течение ночи при комнатной температуре без встряхивания. После 20-24 часов уравновешивания покрытый антителом планшет блокировали блокирующим буфером A (MSD) в течение 30 минут при комнатной температуре и промывали промывочным буфером (PBS, 0,1% BSA, 0,05% Tween-20) перед добавлением уравновешенных комплексов антитело-антиген к планшету в течение ровно 2,5 минут. Планшет снова промывали промывочным буфером перед добавлением 250 нг/мл меченного SULFO-TAG вторичного реагента стрептавидина (MSD) в PBS с 0,1% BSA. После промывания промывочным буфером планшеты считывали в буфере для считывания MSD (MSD) с использованием MESO QuickPlex SQ 120 (MSD). Данные связывания обрабатывали путем подбора нелинейной кривой в программном обеспечении Prism 7 (Graphpad) для расчета значений KD равновесного связывания.

Пример 2: Функциональные анализы для измерения ингибирования латентной активации TGFβ1

[843] Разработка новых контекстно-зависимых клеточных анализов активности активации TGFβ1 описана в WO 2019/023661, включенной в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме. Предыдущие форматы анализов не могли различить активацию proTGFβ1, презентируемого эндогенными презентирующми молекулами, и активацию proTGFβ1, презентируемого экзогенными LTBP. Посредством прямой трансфекции клеток, экспрессирующих интегрин, новые анализы, раскрываемые в WO 2019/023661 и используемые в настоящем документе, определяют окно между активностью эндогенного презентатора-proTGFβ1 и активностью экзогенного LTBP-proTGFβ1. Поскольку комплексы LTBP-proTGFβ1 встроены во внеклеточный матрикс, покрытие аналитического планшета также является важным компонентом анализа. Применение

планшетов с высоким связыванием, покрытых белком ECM фибронектином, сделало анализы LTBP более надежными.

[844] Чтобы определить, являются ли антитела Ab4, Ab5, Ab6 и Ab3 функциональными (например, обладают ли они ингибирующей активностью), разрабатывали клеточные анализы, в которых измеряли зависимое от интегрина αVβ высвобождение фактора роста TGFβ1 из больших латентных комплексов (LLC). Каждый анализ был специфичен для каждого из LLC, содержащих LTBP1, LTBP3, GARP или LRRC33. В процессе разработки и оптимизации анализа определяли, что фибронектин представлял критический белок ECM для интегрин-зависимой активации *in vitro* LTBP-презентируемого proTGFβ1.

Анализ I. Активация латентного TGFβ1, отложенного в ECM

[845] Для анализов, изображенных на фиг. **1** и фиг. **2**, разрабатывали следующий протокол. Этот анализ являлся оптимальным для измерения интегрин-зависимого высвобождения TGFβ1 из ассоциированных с ECM латентных комплексов proTGFβ1 (LTBP1-proTGFβ1 или LTBP3-proTGFβ1).

[846] Материалы:

- Клетки MvLu1-CAGA12 (клон 4A4)
- Клетки SW480/β6 (клон 1E7) (субъединица αV эндогенно экспрессируется при высоком уровне; субъединица β6 стабильно сверхэкспрессируется)
- Клеточная линия LN229 (высокие уровни эндогенного интегрина αVβ8)
- 96-луночный аналитический планшет Costar с белыми стенками, обработанный TC № 3903
- Белый 96-луночный непрозрачный планшет для анализа Greiner Bio-One High Binding White № 655094
- Фибронектин человека (Corning № 354008)
- Многоканальная пипетка P200
- Пипетки P20, P200 и P1000 со стерильными фильтрующими наконечниками для каждой
- Стерильные пробирки для микроцентрифугирования и штатив
- Стерильные резервуары для реагентов
- 0,4% трипановый синий
- Стерильные пипетки на 2, 5, 10 и 25 мл
- Обработанные тканевой культурой планшеты на 100 мм или 150 мм
- 70% этанол

- Opti-MEM с пониженным содержанием сыворотки (Life Tech № 31985-070)
- Липофектамин 3000 (Life Tech № L3000015)
- Реагент для анализа люциферазы Bright-Glo (Promega № E2620)
- 0,25% трипсин + 0,53 мМ EDTA
- Плазмида экспрессии proTGFβ1 человека
- Плазмида экспрессии LTBP1S человека
- Плазмида экспрессии LTBP3 человека
- Плазмида экспрессии LRRC32 (GARP) человека
- Плазмида экспрессии LRRC33 человека

[847] Оборудование:

- Планшет-ридер BioTek Synergy H1
- Воронка ТС
- Настольная центрифуга
- CO_2-инкубатор, 37 °C, 5% CO_2
- Водяная баня с гранулами, 37 °C
- Шейкер с платформой
- Микроскоп
- Гемоцитометр/без значений

[848] Определения:

- Клетки CAGA12 4A4: производное клеток MvLu1 (эпителиальные клетки легких норки), стабильно трансфицированные синтетическим промотором CAGA12, контролирующим экспрессию гена люциферазы
- DMEM-0,1%BSA: среда для анализа; основная среда представляет собой DMEM (Gibco Cat № 11995-065), среда также содержит BSA, разведенный до 0,1% масс./об., пенициллин/стрептиномицин и 4 мМ глутамин.
- D10: DMEM 10% FBS, P/S, 4 мМ глутамин, 1% NEAA, 1× GlutaMAX (Gibco № в кат. 35050061)
- Среда SW480/β6: D10 + 1000 мкг/мл G-418
- Среда CAGA12 (4A4): D10 + 0,75 мкг/мл пуромицина

[849] Процедура:

[850] в 0-й день клетки засевали для трансфекции. Клетки SW480/β6 (клон 1E7) отделяли с помощью трипсина и осаждали (центрифугирование в течение 5 минут при 200× g). Клеточный осадок ресуспендировали в среде D10 и подсчитывали количество жизнеспособных клеток на мл. Клетки высевали в планшет для тканевых культур по 5,0 ×

10^6 клеток/12 мл/100 мм. Для клеток CAGA12 клетки пассировали при плотности 1,0 миллион на колбу T75 для использования в анализе на 3-й день. Культуры инкубировали при 37°C и 5% CO_2.

[851] В 1-й день трансфицировали экспрессирующие интегрин клетки. При трансфекции реагентом липофектамином® 3000 соблюдали протокол производителя. Вкратце, в OptiMEM™ I разводили по 125 мкл на лунку: 7,5 мкг ДНК (презентирующая молекула) + 7,5 мкг ДНК (proTGFβ1), 30 мкл P3000 и до 125 мкл с помощью OptiMEM I. Лунку перемешивали с помощью совместного пипетирования ДНК, затем добавляли OptiMEM. Добавляли P3000, и все тщательно перемешивали с помощью пипетирования. Готовили мастер-микс из липофектамина 3000 для добавления к смесям ДНК: для анализа LTBP1: 15 мкл липофектамина 3000, до 125 мкл в OptiMEM I на лунку; для анализа LTBP3: 45 мкл липофектамина 3000, до 125 мкл в OptiMEM I на лунку. Разведенный липофектамин 3000 добавляли к ДНК, хорошо перемешивали с помощью пипетирования и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. После инкубации раствор несколько раз перемешивали с помощью пипетирования, а затем по каплям добавляли 250 мкл смеси ДНК:липофектамин 3000 (2 × 125 мкл) на планшет. Каждый планшет осторожно встряхивали для перемешивания и планшет возвращали в инкубатор для тканевых культур на ~ 24 часа.

[852] На 1-й-2-й дни аналитические планшеты покрывали фибронектином человека. В частности, лиофилизированный фибронектин разбавляли до 1 мг/мл в сверхчистой дистиллированной воде (стерильной). Исходный раствор с концентрацией 1 мг/мл разводили до 19,2 мкг/мл в PBS (стерильном). Добавляли 50 мкл/лунка к аналитическому планшету (с высоким связыванием) и инкубировали в течение ночи в инкубаторе для тканевых культур (37 °C и 5% CO_2). Конечная концентрация составила 3,0 мкг/$см^2$.

[853] На 2-й день трансфицированные клетки высевали для анализа и добавления ингибитора. Сначала покрытие фибронектином промывали с помощью добавления 200 мкл/лунка PBS к раствору фибронектина, уже находящемуся в планшете для анализа. Промывочную жидкость удаляли вручную с помощью многоканальной пипетки. Всего промывку повторяли два раза. Планшету давали высохнуть при комнатной температуре с закрытой крышкой перед добавлением клеток. Затем клетки высевали с помощью отделения трипсином и осаждали (центрифугирование в течение 5 минут при 200× g). Осадок ресуспендировали в среде для анализа и подсчитывали количество жизнеспособных клеток на мл. Для анализа LTBP1 клетки разводили до 0,10 × 10^6 клеток/мл и засевали по 50 мкл на лунку (5000 клеток на лунку). Для анализа LTBP3 клетки разводили до 0,05 × 10^6

клеток/мл и засевали по 50 мкл на лунку (2 500 клеток на лунку). Для приготовления функциональных разведений антител, антитела предварительно разводили до постоянной рабочей концентрации в носителе. Исходные антитела серийно разводили в носителе (оптимальным является PBS, следует избегать натрий-цитратного буфера). Каждую точку серийного разведения разводили в среде для анализа для получения 4× конечной концентрации антитела. Добавляли 25 мкл на лунку 4×антител и инкубировали культуры при 37°C и 5% CO_2 в течение ~ 24 часов.

[854] На 3-й день добавляли репортерные клетки с TGFβ. Клетки CAGA12 (клон 4A4) для анализа отделяли с помощью трипсина и осаждали (центрифугирование в течение 5 минут при 200× g). Осадок ресуспендировали в среде для анализа и подсчитывали количество жизнеспособных клеток на мл. Клетки разводили до 0,4 × 10^6 клеток/мл и засевали 50 мкл на лунку (20000 клеток на лунку). Клетки возвращали в инкубатор.

[855] На 4-й день результаты анализа считывали (через 16-20 часов после добавления антител и/или репортерных клеток). Реагенту Bright-Glo™ и исследуемому планшету перед считыванием давали нагреться до комнатной температуры. Параметры считывания на BioTek® Synergy™ H1 устанавливали с использованием протокола TMLC_std – данный способ имеет настройку автоматического усиления. Выбирали лунки с положительным контролем для автомасштабирования (высокие). На лунку добавляли 100 мкл реагента Bright-Glo. Инкубировали в течение 2 минут при встряхивании при комнатной температуре в защищенном от света месте. Планшет считывали на BioTek Synergy H1.

[856] Ингибирование активации LTBP1-proTGBβ1 с помощью Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 или контрольного IgG измеряли в репортерном анализе LN229 (фиг. **1**).

[857] Ингибирование активации LTBP3-proTGBβ1 с помощью Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 или контрольного IgG измеряли в репортерном анализе LN229 (фиг. **2**).

Анализ II. Активация латентного TGFβ1, презентируемого на поверхности клетки

[858] Для анализа, изображенного на фиг. **3** и фиг. **4**, разрабатывали следующий протокол. Этот анализ, или «прямая трансфекция», являлся оптимальным для измерения интегрин-зависимого высвобождения TGFβ1 из ассоциированных с клетками латентных комплексов proTGBβ1 (GARP-proTGBβ1 или LRRC33-proTGBβ1).

[859] Материалы:

- Клетки MvLu1-CAGA12 (клон 4A4)
- Клетки SW480/β6 (клон 1E7) (субъединица αV эндогенно экспрессируется при высоком уровне; субъединица β6 стабильно сверхэкспрессируется)
- Клеточная линия LN229 (высокие уровни эндогенного интегрина αVβ8)

- 96-луночный аналитический планшет Costar с белыми стенками, обработанный ТС № 3903
- Белый 96-луночный непрозрачный планшет для анализа Greiner Bio-One High Binding White № 655094
- Фибронектин человека (Corning № 354008)
- Многоканальная пипетка P200
- Пипетки P20, P200 и P1000 со стерильными фильтрующими наконечниками для каждой
- Стерильные пробирки для микроцентрифугирования и штатив
- Стерильные резервуары для реагентов
- 0,4% трипановый синий
- Стерильные пипетки на 2 мл, 5 мл, 10 мл и 25 мл
- Обработанные тканевой культурой планшеты на 100 мм или 150 мм
- 70% этанол
- Opti-MEM с пониженным содержанием сыворотки (Life Tech № 31985-070)
- Липофектамин 3000 (Life Tech № L3000015)
- Реагент для анализа люциферазы Bright-Glo (Promega № E2620)
- 0,25% трипсин + 0,53 мМ EDTA
- Плазмида экспрессии proTGFβ1 человека
- Плазмида экспрессии LTBP1S человека
- Плазмида экспрессии LTBP3 человека
- Плазмида экспрессии LRRC32 (GARP) человека
- Плазмида экспрессии LRRC33 человека

[860] Оборудование:

- Планшет-ридер BioTek Synergy H1
- Воронка для тканевых культур
- Настольная центрифуга
- CO_2 инкубатор, 37 °C, 5% CO_2
- Водяная баня с гранулами, 37 °C
- Шейкер с платформой
- Микроскоп
- Гемоцитометр/без значений

[861] Определения:

- Клетки CAGA12 4A4: производное клеток MvLu1 (эпителиальные клетки легких норки), стабильно трансфицированные синтетическим промотором CAGA12, контролирующим экспрессию гена люциферазы
- DMEM-0,1%BSA: среда для анализа; основная среда представляет собой DMEM (Gibco Cat № 11995-065), среда также содержит BSA, разведенный до 0,1% масс./об., пенициллин/стрептиномицин и 4 мМ глутамин.
- D10: DMEM 10% FBS, P/S, 4 мМ глутамин, 1% NEAA, 1× GlutaMAX (Gibco № в кат. 35050061)
- Среда SW480/β6: D10 + 1000 мкг/мл G-418
- Среда CAGA12 (4A4): D10 + 0,75 мкг/мл пуромицина

[862] Способы

[863] в 0-й день экспрессирующие интегрин клетки засевали для трансфекции. Клетки отделяли с помощью трипсина и осаждали (центрифугирование в течение 5 минут при 200× g). Осадок клеток ресуспендировали в среде D10 и подсчитывали количество жизнеспособных клеток на мл. Клетки разводили до $0,1e^6$ клеток/мл и высевали по 100 мкл на лунку (10000 клеток на лунку) в планшет для анализа. Клетки CAGA12 пассировали при плотности 1,5 миллиона на колбу T75 для использования в анализе на 2-й день. Культуры инкубировали при 37°C и 5% CO_2.

[864] В 1-й день клетки трансфицировали. При трансфекции реагентом липофектамином 3000 соблюдали протокол производителя. Вкратце, в OptiMEM I разводили по 5 мкл на лунку: 0,1 мкг ДНК (презентирующая молекула) + 0,1 мкг ДНК (proTGFβ1), 0,4 мкл P3000 и до 5 мкл с помощью OptiMEM I. Лунку перемешивали с помощью совместного пипетирования ДНК, затем добавляли OptiMEM. Добавляли P3000 и тщательно перемешивали с помощью пипетирования. Мастер-микс готовили с помощью липофектамина 3000, добавляемого к ДНК-миксам: 0,2 мкл липофектамина 3000, до 5 мкл в OptiMEM I на лунку. Разведенный липофектамин 3000 добавляли к ДНК, хорошо перемешивали с помощью пипетирования и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. После инкубации раствор несколько раз перемешивали с помощью пипетирования, а затем добавляли 10 мкл на лунку смеси ДНК:липофектамин 3000 (2 × 5 мкл). Планшет для клеток возвращали в инкубатор для тканевых культур ткани на ~ 24 часа.

[865] На 2-й день добавляли антитело и репортерные клетки с TGFβ. Для приготовления функциональных разведений антител, исходное антитело в носителе (оптимальным является PBS) серийно разводили. Затем каждую точку разводили в среде для анализа до 2× конечной концентрации антитела. После приготовления антител планшет

с клетками дважды обрабатывали средой для анализа путем аспирации (вакуумный аспиратор) с последующим добавлением 100 мкл среды для анализа на лунку. После второй промывки среду для анализа заменяли 50 мкл на лунку 2× антитела. Планшет с клетками возвращали в инкубатор на ~ 15-20 минут.

[866] Для приготовления клеток CAGA12 (клон 4A4) для анализа клетки отделяли с помощью трипсина и осаждали (центрифугирование в течение 5 минут при 200× g). Клеточный осадок ресуспендировали в среде D10 и подсчитывали количество жизнеспособных клеток на мл. Клетки разводили до $0,3e^6$ клеток/мл и засевали 50 мкл на лунку (15000 клеток на лунку). Клетки возвращали в инкубатор.

[867] На 3-й день результаты анализа считывали приблизительно через 16-20 часов после добавления антител и/или репортерных клеток. Реагенту Bright-Glo™ и исследуемому планшету перед считыванием давали нагреться до комнатной температуры. Параметры считывания на BioTek® Synergy™ H1 устанавливали с использованием протокола TMLC_std – данный способ имеет настройку автоматического усиления. Лунки с положительным контролем устанавливали для автомасштабирования (высокие). На лунку добавляли 100 мкл реагента Bright-Glo. Инкубировали в течение 2 минут при встряхивании при комнатной температуре в защищенном от света месте. Планшет считывали на BioTek Synergy H1.

[868] Ингибирование активации GARP-proTGFβ1 с помощью Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 или контрольного IgG измеряли в анализе SW480β6 (фиг. **3**).

[869] Ингибирование активации LRRC33-proTGFβ1 с помощью Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 или контрольного IgG измеряли в анализе SW480β6 (фиг. **4**).

[870] Клеточные репортерные анализы, используемые для получения данных активности in vitro, представленных на фиг. 33B, представлены ниже.

[871] За два дня до анализа 12500 клеток LN229 на лунку помещали в 96-луночные планшеты с белыми стенками для анализа, обработанные культурой ткани. Клетки LN229 трансфицировали на следующий день плазмидами, кодирующими либо proTGFβ1 (анализ LTBP), либо proTGFβ1 вместе с GARP (анализ GARP), либо proTGFβ1 вместе с LRRC33 (химерная конструкция эктодомена LRRC33, слитого с трансмембранными доменами GARP и цитоплазматическими доменами GARP с помощью липофектамина 3000). В качестве контроля специфичности изоформы TGFβ1 клетки LN229 трансфицировали proTGFβ3, который также активируется интегринами αV в результате присутствия последовательности RGD в его продомене. Через приблизительно 24 часа Ab6 серийно разводили и добавляли к трансфектантам вместе с репортерными клетками CAGA12, суспендированными в DMEM + 0,1% BSA (15000 клеток на лунку). Через приблизительно

16-20 часов после образования кокультуры анализ осуществляли в течение 2 минут с использованием реагента BrightGlo и люминесценцию считывали на планшет-ридере. Активность люциферазы в присутствии носителя-антитела определяли как 100% активность, а сигнал в присутствии 167 нМ (25 мкг/мл) высокоаффинного антитела panTGFβ 12,7 определяли как 0% активность.

[872] Активности «доза-ответ» нелинейно соответствовали трехпараметрической логарифмической модели зависимости ингибитора от ответа с использованием Prism 7 и рассчитывали наиболее подходящие значения IC50.

[873] Для исследования ингибирования протеолитической активации TGFβ1, репортерные клетки CAGA12 высевали в 96-луночные планшеты с белыми стенками для анализа люминесценции (12500 клеток на лунку). Через двадцать четыре часа клетки промывали средой для анализа (DMEM + 0,1% BSA), и Ab6 (2,5 мкг/мл) и малый латентный комплекс proTGFβ1 C4S (1,5 нг/мл) добавляли в среду для анализа к клеткам CAGA. Эту смесь инкубировали при 37 °C в течение 4 часов для связывания антител. После этой инкубации добавляли рекомбинантную протеазу калликреин плазмы крови человека (EMD Millipore) до конечной концентрации 500 нг/мл. Смесь для анализа инкубировали с клетками CAGA в течение приблизительно 18 часов, после чего активацию TGFβ1 считывали с помощью биолюминесценции, как описано выше.

Пример 3: Эффекты TGFβ1-специфических контекстно-независимых антител на индуцированную протеазой активацию TGFβ1 in vitro

[874] Ранее заявитель продемонстрировал, что Ab3 (селективный в отношении изоформы контекстно-зависимый ингибитор TGFβ1) способен ингибировать как интегрин-зависимую, так и калликреин-зависимую активацию TGFβ1 in vitro и в клеточных анализах/анализах CAGA.

[875] Для исследования способности Ab6 (селективного в отношении изоформы высокоаффинного контекстно-независимого ингибитора TGFβ1) ингибировать протеазозависимую активацию TGFβ1 и для дальнейшего сравнения эффектов Ab3 и Ab6, два клеточных анализа/анализа CAGA: i) калликреин-зависимую активацию TGFβ1 и эффекты Ab3 и Ab6; и ii) плазмин-зависимую активацию TGFβ1 и эффекты Ab3 и Ab6.

[876] Вкратце, репортерные клетки CAGA высевали за 24 часа до начала анализа. ProTGFβ1-C4S титровали в отношении клеток CAGA. Протеазу (KLK плазмы крови или плазмин) добавляли в указанной фиксированной концентрации. Смесь для анализа инкубировали в течение приблизительно 18 часов. Активацию TGFβ измеряли с помощью люциферазного анализа.

[877] В первом исследовании в присутствии KLK активировали proTGFβ1 (положительный контроль). Активацию TGFβ эффективно ингибировали добавлением Ab3, что подтверждает предыдущие результаты. Аналогичным образом, Ab6 также ингибировало калликреин-индуцированную активацию TGFβ1. Эти результаты указывают на то, что, помимо интегрин-зависимой активации TGFβ1, специфическое в отношении изоформы контекстно-независимое ингибирующее антитело (как смещенное, так и несмещенное) может блокировать KLK-зависимую активацию TGFβ1 in vitro (фиг. **5A**).

[878] Во втором исследовании в присутствии рекомбинантного плазмина человека активировали proTGFβ1 (положительный контроль). Неожиданно эту активацию TGFβ эффективно ингибировало только Ab6, но не Ab3. Эти результаты демонстрируют неожиданные функциональные различия между контекстно-смещенным ингибитором (Ab3) и контекстно-несмещенным ингибитором (Ab6) (фиг. **5B**).

Пример 4: Ингибирование острого фиброза антителами Ab3 и Ab6 к TGFβ1 в модели односторонней обструкции мочеточника (UUO) острого фиброза почек

[879] Ингибирование острого фиброза антителами к TGFβ1 исследовали в модели односторонней обструкции мочеточника (UUO) острого фиброза почек. В этой модели фиброз индуцировали у самцов мышей путем перманентного хирургического лигирования левого мочеточника в 0-й день исследования. Мышей, обработанных плацебо, которые перенесли хирургическое вмешательство, но у которых не было обструкции мочеточников, включали в эти эксперименты в качестве здорового контроля.

[880] Контрольные (IgG) или исследуемые антитела (Ab3, Ab6) вводили мышам с помощью внутрибрюшинной (i.p.) инъекции в 1-й и 4-й дни исследования. Почки собирали в конце исследования, на 5-й день после хирургического вмешательства, и из этих тканей собирали РНК. Затем степень индукции фиброза оценивали с помощью количественной полимеразной цепной реакции (qPCR) для панели генов, ассоциированных с фиброзом, включая коллаген I (*Col1a1*), коллаген III (*Col3a1*), фибронектин 1 (*Fn1*), лизилоксидазу (*Lox*), лизилоксидаза-подобный белок 2 (*Loxl2*), актин гладких мышц (*Acta2*), матриксную металлопротеиназу (*Mmp2*) и интегрин альфа 11 (*Itga11*). (Rolfe, Irvine, Grobbelaar, & Linge, 2007)(Tamaki et al., 1994)(Bansal et al., 2017)(Leaf & Duffield, 2016).

Влияние обработки Ab3 или Ab6 на экспрессию гена коллагена

[881] *Col1a1* и *Col3a1* представляют собой ключевые факторы фиброза. *Col1a1* индуцируется в 10-40 раз в почках с обструкцией, а *Col3a1* активируется в 5-25 раз ($P < 0{,}005$, при сравнении мышей, обработанных плацебо + IgG, с группой UUO + IgG). Как изображено на фиг. 7, мыши UUO, обработанные 3, 10 или 30 мг/кг/неделя Ab3,

демонстрируют сниженную экспрессию обоих генов коллагена по сравнению с UUO + IgG (P <0,05). Обработка 3 или 10 мг/кг/неделя Ab6 также подавляла индукцию фиброзного гена UUO (P <0,05 по сравнению с UUO + IgG). В совокупности эти данные позволяют предположить, что ингибирование TGFβ1 либо с помощью Ab3, либо с помощью Ab6 значительно улучшает индукцию коллагена, ассоциированную с UUO.

Влияние обработки Ab3 или Ab6 на экспрессию гена фибронектина и гена лизилоксидазоподобного белка 2

[882] *Fn1* и *Loxl2* кодируют белки, которые играют роль в отложении и жесткости внеклеточного матрикса при фиброзе. Как изображено на фиг. **8,** оба гена активировались в образцах из группы UUO + IgG (P <0,005 по сравнению с плацебо + IgG), хотя кратное повышение экспрессии генов для обоих генов, но особенно для *Loxl2*, было меньшим, чем для генов коллагена. В образцах, обработанных 3, 10 или 30 мг/кг/ неделя Ab3, отмечали тенденцию к снижению экспрессии *Fn1* и *Loxl2* (по сравнению с UUO + IgG), но этот эффект обработки являлся статистически значимым только для экспрессии *Loxl2* и только в дозе 3 мг/кг/неделя (*Fn1* в дозе 10 мг/кг/неделя приближается к статистической значимости, при P = 0,07). Однако обработка 3 или 10 мг/кг/неделя Ab6 приводила к ингибированию как *Fn1*, так и *Loxl2* (P < 0,05 по сравнению с UUO + IgG).

[883] На фиг. **9** обобщена статистическая значимость изменений экспрессии генов (по сравнению с UUO + IgG) после обработки в модели UUO. Ab3 продемонстрировало снижение *Col1a1* и *Col3a1* во всех исследуемых дозах. Статистически значимые изменения также наблюдали в случае *Itga11* и *Loxl2* (оба уровня были снижены по сравнению с UUO + IgG), но только в дозе 3 мг/кг/неделя. В отличие от этого, все исследованные гены, кроме *Acta2*, продемонстрировали статистически значимое изменение экспрессии (все уровни снижены по отношению к UUO + IgG) после обработки 10 мг/кг/неделя Ab6. Кроме того, все исследованные гены, за исключением *Acta2* и *Lox*, также продемонстрировали статистически значимое снижение у мышей, обработанных Ab6 в дозе 3 мг/кг/неделя.

Пример 5: Эффекты Ab3 и Ab6 в комбинации с антителом к PD-1 на прогрессирование опухоли в модели меланомы Cloudman S91

[884] Основываясь на признании того, что многие опухоли человека характеризуются фенотипом: i) подгруппа восприимчива к блокаде оси PD-(L)1; ii) доказательство иммунного исключения; и, iii) доказательство экспрессии TGFB1 и передачи сигналов с участием TGFβ, и, кроме того, на основании наблюдения, что обычно используемые сингенные иммунно-онкологические мышиные модели не повторяют смещение TGFβ1 или устойчивость к антителу к PD-(L)1, изобретатели стремились

специально отобрать доклинические модели in vivo, которые демонстрируют профили, аналогичные профилям опухолей человека, для улучшенной способности воспроизведения (см. пример 11). Принимая во внимание эти факторы, для проведения исследований эффективности выбирали подходящие модели in vivo, включая модель меланомы Cloudman S91, описанную в этих исследованиях.

[885] Для оценки эффектов Ab3 и Ab6 в комбинации с антителом к PD-1 на уменьшение прогрессирования опухоли-меланомы использовали мышиную модель меланомы Cloudman S91.

Культивирование опухолевых клеток

[886] Клетки клона M3 [меланома Cloudman S91] (ATCC® CCL-53.1™) получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC) и поддерживали в CR Discovery Services в виде экспоненциально растущих суспензионных культур в среде Хэма F12 в модификации Кайна с добавлением 2,5% фетальной бычьей сыворотки, 15% лошадиной сыворотки, 2 мМ глутамина, 100 единиц/мл пенициллина G натрия, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина и 25 мкг/мл гентамицина. Опухолевые клетки выращивали в колбах для тканевых культур в увлажненном инкубаторе при 37 °C, в атмосфере, содержащей 5% CO_2 и 95% воздуха.

Имплантация in vivo и рост опухоли

[887] В день имплантации опухоли каждой исследуемой самке мыши DBA/2 вводили подкожно в бок 5×10^6 клеток Cloudman S91 в 50% матригеле и отслеживали рост опухоли. Когда опухоли достигали объема 125-175 мм^3, мышей рандомизировали на группы по 12 особей с одинаковыми средними объемами опухолей и начинали введение. Опухоли измеряли в двух измерениях с помощью штангенциркулей и объем рассчитывали с помощью формулы:

Объем опухоли (мм^3) = w^2 x l / 2,

где w = ширина и l = длина опухоли в мм. Массу опухоли оценивали, исходя из предположения, что 1 мг эквивалентен 1 мм^3 объема опухоли.

Обработка

[888] Вкратце, мышам (n = 12) с подкожными опухолями C91 (125-175 мм^3) в 1-й день вводили внутрибрюшинно (i.p.) один раз в неделю в течение 60 дней Ab3 в дозе 10 мг/кг в объеме дозы 10 мл/кг; Ab3 в дозе 30 мг/кг в объеме дозы 10 мл/кг; Ab6 в дозе 3 мг/кг в объеме дозы 10 мл/кг; или Ab6 в дозе 10 мг/кг в объеме дозы 10 мл/кг. Антитело крысы к PD-1 мыши (RMP1-14-rIgG2a, BioXCel) вводили i.p. два раза в неделю по 10 мг/кг в объеме дозы 10 мл/кг в течение 60 дней.

[889] Группа 1 получала одно антитело к PD-1. Группа 2 получала Ab3 (10 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1. Группа 3 получала Ab3 (30 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1. Группа 4 получала Ab6 (10 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1. Группа 5 получала Ab6 (30 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1. Использовали необработанный контроль, данные не продемонстрированы.

Анализ конечных точек и задержки роста опухоли (TGD)

[890] Опухоли измеряли с помощью штангенциркулей два раза в неделю и каждое животное выводили из эксперимента, когда его опухоль достигала объема конечной точки 2000 мм^3 или в конце исследования (60-й день), в зависимости от того, что происходило раньше. Мышей, которые завершали исследование в связи с конечной точкой объема опухоли, характеризовали как выведенных из эксперимента в результате прогрессирования опухоли (TP), с указанием даты выведения из эксперимента. Время до конечной точки (TTE) анализа рассчитывали для каждой мыши с помощью способов, описанных в WO 2018/129329.

[891] Процент задержки роста опухоли (% TGD) определяли как увеличение среднего времени до конечной точки в группе обработки по сравнению с необработанным контролем, выраженное как процент от среднего времени до конечной точки (TTE) контроля:

T = медиана TTE для обработки

C = медиана TTE для контроля

%TGD = ((T-C)/C)*100

[892] Обработка антителом к PD1 приводила к 25% TGD по сравнению с обработкой изотипическим контролем. Антитело к PD1/Ab3 в дозе 10 мг/кг приводило к 14% TGD, тогда как антитело к PD1/Ab3 в дозе 30 мг/кг приводило к 92% TGD. Медианное время до конечной точки для антитела к PD1/Ab3 в дозе 30 мг/кг составляло 45,8 дней по сравнению с 29,8 днями при обработке одним антителом к PD1.

[893] Во втором исследовании с использованием Cloudman S91 обработка антителом к PD-1 приводила к 48% TGD по сравнению с обработкой изотипическим контролем. Антитело к PD-1/Ab3 в дозе 10 мг/кг приводило к 122% TGD, тогда как антитело к PD-1/Ab3 в дозе 30 мг/кг приводило к 217% TGD. Антитело к PD-1/Ab6 в обеих дозах 10 и 30 мг/кг приводило к 217% TGD. Медианное время до конечной точки для антитела к PD-1 составляло 34,6 дня, для антитела к PD-1/Ab3 в дозе 10 мг/кг составляло 51,7 дня и в дозе 30 мг/кг до конца исследования через 74 дня. Антитело к PD-1/Ab6 как в дозе 10 мг/кг, так и в дозе 30 мг/кг не достигло медианной выживаемости в конце исследования через 74 дня.

[894] Результаты исследования демонстрируют, что введение Ab3 в дозе 30 мг/кг в комбинации с антителом к PD-1 увеличивало выживаемость обработанных мышей. Как изображено на фиг. **10**, для достижения 50% выживаемости мышам, обработанным антителом к PD-1/Ab3 в дозе 30 мг/кг, потребовалось приблизительно 45 дней, в то время как мыши, обработанные Ab3 в дозе 10 мг/кг и одним антителом к PD-1, достигали 50% выживаемости менее чем за приблизительно 30 дней, что указывает на то, что одновременное ингибирование PD-1 и TGFβ1 приводило к увеличению выживаемости.

[895] Как изображено на фиг. **11A,** введение Ab3 или Ab6 в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг в комбинации с антителом к PD1 задерживало рост опухоли. 8 мышей, обработанных одним антителом к PD-1, достигали объема опухоли 2000 мм^3 (как указано пунктирной линией), тогда как только 6 мышей, обработанных антителом к PD-1 и Ab3 в дозе 10 мг/кг, и 4 мыши, обработанные антителом к PD-1 и Ab3 в дозе 30 мг/кг достигали объема опухоли 2000 мм^3. Только 3 мыши, обработанные антителом к PD-1 и Ab6 в дозе 10 мг/кг, и 5 мышей, обработанные антителом к PD-1 и Ab6 в дозе 30 мг/кг, достигали объема опухоли 2000 мм^3. На фиг. **11B** продемонстрировано медианное прогрессирование опухоли после обработки Ab3 или Ab6 в комбинации с антителом к PD-1.

[896] Отдельное исследование с использованием S91 выполняли для оценки эффективного контроля над опухолью, достигаемого с помощью комбинации антитела к PD-1 и Ab6 (в дозах 3, 10 и 30 мг/кг). Для количественной оценки противоопухолевого ответа «эффективный контроль опухоли» в ответ на обработку определяли как процент животных в каждой исследуемой группе, у которых объем опухоли к концу исследования составлял менее 25% от порога выживаемости 2000 мм^3 (например, конечной точки объема опухоли). Результаты обобщены ниже (см. фиг. **11C, 11E** и **11F**).

Таблица 20. Обобщенное представление эффективности Cloudman S91

Группа обработки	**Модель опухоли Cloudman S91 (эффективный контроль опухоли: %, N)**
Контроль	0% (0/11)
Монотерапия антителом к PD1	17% (2/12)
Монотерапия Ab6	0% (0/12)
Антитело к PD1/Ab6, 3 мг/кг	83% (10/12)
Антитело к PD1/Ab6, 10 мг/кг	78% (7/9)
Антитело к PD1/Ab6, 30 мг/кг	73% (8/11)

[897] Как изображено на фиг. **11C**, большинство животных, получавших комбинированную обработку во всех трех дозах (83%, 78% и 73% соответственно), достигали эффективного контроля опухоли (например, объем опухоли уменьшался до 500 мм^3 или менее), даже если модель Cloudman S91 признавали слабо ответившей на блокаду

PD-1 в качестве монотерапии, демонстрируя устойчивые синергические эффекты Ab6. Таким образом, в модели сингенной мышиной опухоли, которая отражает первичную устойчивость человека к терапии блокадой контрольных точек (такой как антитело к PD-(L)1), обработка Ab6 делала опухоли Cloudman S91 (меланома) восприимчивыми к терапии антителом к PD1. Комбинированная обработка Ab6 (всего 3 мг/кг в неделю) и антителом к PD1 приводила к значительной регрессии опухоли или эффективному контролю опухоли. Достигаемая в настоящем документе синергическая задержка роста опухоли указывает на то, что селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 можно применять в сочетании с терапией блокадой контрольных точек для лечения субъектов с TGFβ1-положительной опухолью, которая является устойчивой к ингибированию контрольных точек. В группах комбинированной обработки все исследуемые дозы Ab6 (3 мг/кг, изображено светло-синим цветом; 10 мг/кг, изображено темно-синим цветом и 30 мг/кг, изображено фиолетовым цветом) в сочетании с антителом к PD-1 обеспечивали значительный контроль опухоли (9 из 12, 4 из 9 и 8 из 11 соответственно). В совокупности более 65% этих животных достигали снижения объема опухоли, которое составляет менее 25% от конечного объема опухоли. Результаты также изображали как средний объем опухоли (фиг. 11E). Все группы комбинированной обработки (Ab6 в дозе 3, 10 или 30 мг/кг) продемонстрировали аналогичные противоопухолевые эффекты в исследуемых дозах, что позволяет предположить, что в этой модели Ab6 эффективно при всего лишь 3 мг/кг. Это также отражается на увеличении выживаемости (см. фиг. **11F**).

[898] Продолжительные противоопухолевые эффекты комбинированного ингибирования TGFβ1 и PD-1 исследовали путем прекращения лечения в конце исследования эффективности, описанного выше, и расширения для отслеживания изменений объема опухоли у тех животных, которые достигали значительного контроля опухоли. Ответивших на терапию, испытывающих опухоль CloudmanS91, из фиг. **11C**, наблюдали в течение шести недель при отсутствии введения препаратов (прямоугольник серого цвета). Как изображено на фиг. **11D**, достигали пролонгированный контроль опухоли с помощью комбинации Ab6/антитела к PD-1. Сообщенное количество представляло собой количество животных с контролируемыми опухолями в конце исследования.

[899] Кроме того, в продолжающемся исследовании модели опухоли S91, в которой Ab6 (в дозе 3 мг/кг, 10 мг/кг или 30 мг/кг на дозу) оценивают у животных, которых обрабатывают антителом к PD1, комбинированная обработка приводит к значительному увеличению выживаемости, как изображено на фиг. **11F.** На 38-й день все животные, которые получали комбинацию антитела к PD1/Ab6 (30 мг/кг), выжили (например,

выживаемость 100% на 38-й день в группе с дозой 30 мг/кг), и ни одно из животных в комбинированных группах (3, 10 и 30 мг/кг) не достигало медианной выживаемости (исследование продолжается). В конце исследования 90% животных в группе комбинированного лечения выжили. Эти данные указывают на то, что селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1, такие как Ab6, можно применять для лечения опухолей, устойчивых к ингибированию контрольных точек, у субъектов, получающих терапию блокадой контрольных точек, для достижения преимуществ в отношении выживаемости. Для фиг. **11C-11F**: зеленый = контроль IgG (30 мг/кг еженедельно); оранжевый = Ab6 (30 мг/кг еженедельно); красный = антитело к PD1 (5 мг/кг два раза в неделю); светло-голубой = антитело к PD1 + Ab6 (3 мг/кг); темно-синий = антитело к PD1 + Ab6 (10 мг/кг); фиолетовый = антитело к PD1 + Ab6 (30 мг/кг).

Пример 6: Ингибирование пути фосфо-SMAD2/3 TGFβ с помощью Ab3 и Ab5 в комбинации с антителом к PD-1 на модели сингенного рака мочевого пузыря MBT2

[900] Модель уротелиального рака MBT-2 выбирали в качестве опухоли с преобладанием TGFβ1 для исследования TGFβ1-специфического ингибирования в комбинации с ингибитором контрольной точки. В фармакодинамическом исследовании эффекты Ab3 или Ab5 в комбинации с антителом к PD1 в отношении последующей передачи сигналов с участием TGFβ оценивали на модели MBT-2. Анализы фосфо-SMAD2/3 выполняли с помощью ELISA (Cell Signaling Technologies) в соответствии с инструкциями производителя.

Имплантация in vivo и рост опухоли

[901] В день имплантации опухоли каждой исследуемой самке мыши C3H/HeN вводили подкожно в бок 5×10^5 опухолевых клеток MBT2 и отслеживали рост опухоли. Когда опухоли достигали объема 40-80 мм^3, мышей рандомизировали на группы по 10 особей с одинаковыми средними объемами опухолей и начинали введение. Опухоли измеряли в двух измерениях с помощью штангенциркулей и объем рассчитывали с помощью формулы:

Объем опухоли (мм^3) = $w^2 \times l / 2$,

где w = ширина и l = длина опухоли в мм. Массу опухоли оценивали, исходя из предположения, что 1 мг эквивалентен 1 мм^3 объема опухоли.

Обработка

[902] Вкратце, мышам (n = 10) с подкожными опухолями MBT2 (40-80 мм^3) в 1-й день вводили внутрибрюшинно (i.p.) в 1-й и 8-й дни Ab5 в дозе 3 мг/кг в объеме дозы 10 мл/кг, Ab5 в дозе 10 мг/кг в объеме дозы 10 мл/кг, Ab3 в дозе 10 мл/кг в объеме дозы 10

мл/кг или Ab3 в дозе 10 мг/кг в объеме дозы 10 мл/кг. Антитело крысы к PD-1 мыши (RMP1-14-rIgG2a, BioXCel) вводили i.p. в 1-й, 4-й и 8-й дни по 10 мг/кг в объеме дозы 10 мл/кг.

[903] Группа 1 получала одно антитело к PD-1. Группа 2 получала Ab5 (3 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1. Группа 3 получала Ab5 (10 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1. Группа 4 получала Ab3 (10 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1. Группа 5 получала Ab3 (30 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1. Использовали необработанный контроль, не продемонстрировано.

Подавление передачи сигналов с участием SMAD 2/3

[904] Животных умерщвляли, опухоли удаляли через 8 часов после последней дозы на 8-й день и мгновенно замораживали. Опухоли измельчали в порошок на сухом льду и получали лизаты белков с добавлением ингибиторов фосфатазы.

[905] Результаты оценивали по отношению фосфорилированного SMAD2/3 к общему SMAD2/3. Как изображено на фиг. **12**, передачу тонического сигнала с участием SMAD2/3 значительно подавляли у животных, обработанных как Ab3, так и Ab5 в комбинации с антителом к PD-1, при этом Ab5 (10 мг/кг) демонстрировало наиболее значительное подавление. Эти данные демонстрируют эффективное целевое взаимодействие ингибиторов активации TGFβ1, что приводит к подавлению последующей передачи сигналов.

Пример 7: Эффекты Ab3 и Ab6 в комбинации с антителом к PD-1 на прогрессирование опухоли в мышиной модели сингенного рака мочевого пузыря MBT2

[906] Для оценки способности Ab3 и Ab6 в комбинации с антителом к PD-1 уменьшать прогрессирование опухоли-карциномы мочевого пузыря использовали мышиную модель сингенного рака мочевого пузыря MBT2. Это очень агрессивная и быстрорастущая модель опухоли, и ее очень трудно преодолеть с помощью обработки лекарственными средствами.

Культивирование опухолевых клеток

[907] MBT2 представляет собой низкодифференцированную линию клеток рака мочевого пузыря мышей, происходящую из трансплантируемого рака мочевого пузыря, индуцированного N-[4-(5-нитро-2-фурил)-2-тиазолил]формамидом, у самки мыши C3H/He. Клетки культивировали в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1600 с 10% фетальной бычьей сывороткой и 100 мкг/мл стрептомицина в атмосфере 5% CO_2 при 37 °C. Среду для культивирования заменяли через день, и пересев проводили, когда конфлюэнтность клеток достигала 90%. Клетки собирали из субконфлюэнтных культур трипсинизацией и промывали бессывороточной средой. Суспензии единичных клеток с

жизнеспособностью клеток > 90% определяли с помощью исключения трипановым синим. Перед инъекцией клетки ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS).

Имплантация in vivo и рост опухоли

[908] Клетки MBT2, используемые для имплантации, собирали во время log-фазы роста и ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). В день имплантации опухоли каждой исследуемой мыши вводили подкожно в бок 5×10^5 клеток (0,1 мл клеточной суспензии) и наблюдали за ростом опухоли. Когда опухоли достигали в среднем 40-80 мм^3, мышей рандомизировали на группы по 15 особей.

[909] Опухоли измеряли в двух измерениях с помощью штангенциркулей и объем рассчитывали с помощью формулы:

Объем опухоли (мм^3) = $\underline{w^2}$ x $\underline{l / 2}$,

где w = ширина и l = длина опухоли в мм. Массу опухоли оценивали, исходя из предположения, что 1 мг эквивалентен 1 мм^3 объема опухоли.

Обработка

[910] Вкратце, мышам (n = 15) с подкожными опухолями MBT2 (40-80 мм^3) в 1-й день вводили внутрибрюшинно (i.p.) один раз в неделю в течение 29 дней Ab3 в дозе 10 мг/кг в объеме дозы 10 мл/кг, Ab3 в дозе 30 мг/кг в объеме дозы 10 мл/кг, Ab6 в дозе 3 мг/кг в объеме дозы 10 мл/кг, или Ab6 в дозе 10 мг/кг в объеме дозы 10 мл/кг. Антитело крысы к PD-1 мыши (RMP1-14-rIgG2a, BioXCel) вводили i.p. два раза в неделю по 10 мг/кг в объеме дозы 10 мл/кг в течение 29 дней.

[911] Группа 1 получала одно антитело к PD-1. Группа 2 получала Ab3 (10 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1. Группа 3 получала Ab3 (30 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1. Группа 4 получала Ab6 (3 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1. Группа 5 получала Ab6 (10 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1. Использовали необработанный контроль, не продемонстрировано.

Анализ конечных точек и задержки роста опухоли (TGD)

[912] Опухоли измеряли с помощью штангенциркулей два раза в неделю и каждое животное выводили из эксперимента, когда его опухоль достигала объема конечной точки 1200 мм^3 или в конце исследования. Мышей, которые завершали исследование в связи с конечной точкой объема опухоли, характеризовали как выведенных из эксперимента в результате прогрессирования опухоли (TP), с указанием даты выведения из эксперимента. Время до конечной точки (TTE) анализа рассчитывали для каждой мыши с помощью способов, описанных в WO 2018/129329.

[913] Антитело к PD1/Ab3 в дозе 10 мг/кг приводило к 191% TGD и в дозе 30 мг/кг приводило к 196% TGD. Антитело к PD1/Ab6 в дозе 3 мг/кг приводило к 68% TGD и в дозе

10 мг/кг приводило к 196% TGD. Частичный ответ (PR) в результате обработки определяли как объем опухоли, составляющий 50% или менее от своего объема в 1-й день в случае трех последовательных измерений в течение исследования, и он равнялся или был более 13,5 $мм^3$ в случае одного или нескольких из этих измерений. При полном ответе (CR) объем опухоли составлял менее 13,5 $мм^3$ в случае трех последовательных измерений в течение исследования. Антитело к PD-1/Ab3 в дозе 10 мг/кг приводило к 0 PR и 4 CR в конце исследования. Антитело к PD-1/Ab3 в дозе 30 мг/кг приводило к 1 PR и 1 CR в конце исследования. Антитело к PD-1/Ab6 в дозе 3 мг/кг приводило к 0 PR и 3 CR. Антитело к PD-1/Ab6 в дозе 10 мг/кг приводило к 0 PR и 3 CR.

[914] Как изображено на фиг. **13A** и **13B**, введение Ab3 в обеих дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг в комбинации с антителом к PD-1 задерживало рост опухоли. Некоторые животные демонстрировали полную регрессию опухоли. Кроме того, введение Ab6 в обеих дозах 3 мг/кг и 10 мг/кг в комбинации с антителом к PD-1 задерживало рост опухоли. Некоторые животные демонстрировали полную регрессию опухоли. Большинство мышей, обработанных одним антителом к PD-1, достигали объема опухоли 1024 $мм^3$ (как показано пунктирной линией) между приблизительно 8-й и 14-м днями, тогда как мышам, обработанным Ab3 в дозе 10 мг/кг, Ab3 в дозе 30 мг/кг, Ab6 в дозе 3 мг/кг или Ab6 в дозе 10 мг/кг, потребовалось до 28 дней, чтобы достичь объема опухоли 1024 $мм^3$. На фиг. **11B** продемонстрировано медианное прогрессирование опухоли после обработки Ab3 (вверху слева) или Ab6 (вверху справа) в комбинации с антителом к PD-1. На нижнем графике обобщен медианный объем опухоли ($мм^3$) на 15-й день у мышей, которым вводили Ab3 или Ab6 в комбинации с антителом к PD-1. Медианный объем опухоли на 15-й день у мышей, обработанных Ab3 (10 мг/кг), Ab3 (30 мг/кг) или Ab6 (10 мг/кг) в комбинации с антителом к PD-1, составлял около 500 $мм^3$ или менее, в то время как медианный объем опухоли на 15-й день у мышей, обработанных одним антителом к PD-1, составлял 1000 $мм^3$ или более (нижний график).

[915] На фиг. **13D** представлена эффективность Ab6 в MBT2. Продемонстрировано прогрессирование опухоли у мышей из пяти обработанных групп. Ни одно из животных, которые получали контрольный IgG, одно Ab6 или одно антитело к PD-1, не достигало эффективного контроля опухоли, определяемого как объем опухоли, уменьшенный до 25% или менее от объема конечной точки (продемонстрировано нижними и верхними пунктирными линиями соответственно). В отличие от этого, 12 из 28 животных (~ 43%), получавших комбинированную обработку Ab6/антителом к PD-1, достигали эффективного контроля опухоли, что указывает на то, что одновременное ингибирование путей с

участием PD-1 и TGFβ1 может значительно снижать (например, задерживать или приводить к регрессии) рост опухоли.

[916] Более того, комбинированная обработка была эффективной для продления выживаемости во всех трех обработанных группах по сравнению с одним антителом к PD-1. Как изображено на фиг. **14**, для достижения 50% выживаемости мышам, обработанным Ab3 в дозе 10 мг/кг или Ab6 в дозе 10 мг/кг, потребовалось более 28 дней, в то время как мыши, обработанные одним PD-1, достигали 50% выживаемости через приблизительно 16 дней. В совокупности эти результаты демонстрируют преимущество комбинированной терапии для выживаемости.

Обобщение результатов и обсуждение

[917] *Синергетические эффекты Ab6-антитела к PD-1 на рост опухоли:* обнаружение того, что Ab6 позволяет напрямую оценить гипотезу о том, что избирательное ингибирование активации TGFβ1 будет достаточным для преодоления первичной устойчивости опухоли к СВТ. Для доклинического исследования стремились идентифицировать мышиные сингенные модели опухоли, которые воспроизводят некоторые ключевые особенности опухолей человека, проявляющих первичную устойчивость к СВТ. Критерии выбора модели включали: 1) слабый ответ или его отсутствие на лечение одним средством в виде антитела к PD-(L)1 в дозах, которые, как было продемонстрировано, были эффективны в других моделях сингенных опухолей, 2) доказательство иммунного исключения при недостатке инфильтрирующих CD3+ Т-клеток, 3) доказательство активной передачи сигналов с участием TGFβ и 4) доказательство экспрессии изоформы TGFβ1.

[918] Изучение ответа опухоли и данных профилирования опухоли, включая общедоступные наборы данных RNAseq для всей полученной из опухоли РНК, привело к выбору трех моделей опухолей, которые отвечали этим критериям: модель рака мочевого пузыря MBT-2 (MBT-2), модель меланомы CloudmanS91 (S91) и модель рака молочной железы EMT-6 (EMT-6). Анализ данных RNAseq всей опухоли продемонстрировал повышенную экспрессию генов ответа на TGFβ, указывающую на активацию пути с участием TGFβ, и низкую экспрессию генов эффекторных Т-клеток, что соответствует иммунно-исключенному фенотипу (фиг. 20F). Анализ лизатов всей опухоли с помощью ELISA для определения общей экспрессии белка изоформы TGFβ продемонстрировал, что фактор роста TGFβ1 преобладает во всех трех моделях.

[919] Чтобы оценить Ab6 в сингенных мышиных моделях экспрессировали Ab6 в виде химерного антитела с V-доменами человека Ab6, слитыми с константными доменами IgG1/каппа мыши, для сведения к минимуму иммуногенности. Ab6-mIgG1 обладает

аналогичной ингибирующей активностью, что и полностью человеческое Ab6. Подтверждали, что животные, несущие опухоль MBT-2, устойчивы к антителу к PD-1 (RMP1-14) при введении в терапевтических уровнях, а также к одному Ab6-mIgG1. Однако в комбинации антитело к PD-1 и Ab6-mIgG1 в дозах 3 мг/кг в неделю или 10 мг/кг в неделю приводили к значительному снижению опухолевой нагрузки, включая 21% и 36% выживших без опухоли соответственно, а также значительное преимущество в отношении выживаемости на протяжении каждого исследования (фиг. 13D и 14). В общей сложности 4/14 животных отвечали на антитело к PD-1/Ab6-mIgG1 (3 мг/кг в неделю) и 8/14 животных отвечали на антитело к PD-1/Ab6-mIgG (10 мг/кг в неделю) по сравнению с 0/13 на одно антитело к PD-1. Наблюдали аналогичные ответы на модели меланомы CloudmanS91, слабо ответившей на антитело к PD-1. В этом случае также лечение комбинацией антитело к PD-1/Ab6-mIgG1 приводило к глубокому подавлению опухоли с частотой ответа до 75% и значительным преимуществом выживаемости при всех уровнях доз (см. пример 5).

[920] Затем оценивали устойчивость противоопухолевого ответа у выживших без опухоли MBT-2. Обработку прекращали и за животными наблюдали в течение 7 недель. Рецидива опухоли ни у одного животного не наблюдали (см. пример 8).

[921] Клинически обоснованная гипотеза о том, что передача сигналов с участием TGFβ стимулирует иммунное исключение в ущерб эффективности CBT, а также ранее сообщавшаяся доклиническая демонстрация того, что ингибирование всех форм TGFβ может позволить иммунной системе преодолевать этот механизм устойчивости и способствовать эффективности CBT, частично способствовали изучению того, могут ли значительные опухолевые ответы и преимущество в отношении выживания, наблюдаемые в случае антител по настоящему изобретению, соответствовать соответствующим изменениям в иммунном контексте опухоли.

[922] Для изучения иммунных эффектов обработки антителом к PD-1 или AB6-mIgG1 в качестве отдельных средств или в комбинации, опухоли MBT-2 собирали у мышей через 10 дней после начала обработки, а затем подвергали иммуногистохимическому и проточно-цитометрическому анализами выбранных маркеров иммунных клеток. Несмотря на то, что проточно-цитометрический анализ продемонстрировал, что общий процент CD45+ иммунного компартмента не изменился при обработке, комбинация антителом к PD-1 и Ab6-mIgG1 вызывала десятикратное повышение представленности CD8+ Т-клеток в этом компартменте по сравнению с обработкой изотипическими контрольными антителами (в среднем 34% по сравнению с 3,5% соответственно (фиг. **27B**). Следует отметить, что обработка одним средством в виде антитела к PD-1, по-видимому, приводит к умеренному повышению представленности CD8+ клеток, однако наблюдаемое

повышение не достигало значимости в этом исследовании. Кроме того, анализ РНК, полученной из этих опухолей, продемонстрировал повышение маркеров активации цитотоксических Т-клеток, что согласуется с повышением числа CD8+ клеток и указывает на активную эффекторную функцию этих клеток (фиг. **32D**). Примечательно, что значительное повышение количества CD4+FoxP3+ Treg-клеток также наблюдали при комбинированной обработке. Значимость этого повышения Treg-клеток неясна, учитывая значительные противоопухолевые эффекты, наблюдаемые при комбинированной обработке. В то же время соотношение Treg:CD8 не изменялось в ответ на комбинированную обработку. Интересно, что комбинированная обработка антителом к PD-1/Ab6-mIgG1 также индуцировала значительное снижение общей представленности CD11b+ клеток в опухолях MBT-2. Это, по-видимому, связано с избирательным снижением субпопуляций CD11b+CD206+ и CD11b+Gr1+, которые соответствуют иммуносупрессорным M2-подобным макрофагам и супрессорным клеткам миелоидного происхождения (MDSC) соответственно. В совокупности представленность этих двух популяций клеток снижалась в среднем с 47% популяции CD45+ клеток до 14% после комбинированной обработки (фиг. **28B**). Субпопуляция M1-подобных макрофагов (CD11b+CD206-), по-видимому, не изменилась при обработке, что указывает на то, что блокада PD-1/TGFβ1 оказывает избирательное, но широкое влияние на иммуносупрессорное окружение в опухолях, благотворно влияя как на лимфоидный, так и на миелоидный компартменты.

[923] Конкретный механизм, с помощью которого комбинированное ингибирование PD-1 и TGFβ1 приводит к значительной миграции CD8+ Т-клеток и/или экспансии в микроокружение опухоли, неясен. Таким образом, проводили более подробный гистологический анализ для получения дополнительных сведений о взаимосвязи между активностью пути с участием TGFβ и иммунным исключением. Во-первых, подтверждали с помощью иммуногистохимического анализа значительное повышение CD8+ окрашивания во всех опухолях контрольной группы MBT-2 в соответствии с данными проточной цитометрии (фиг. **30**). Затем проводили иммуногистохимический анализ фосфо-Smad3 (pSmad3), фактора транскрипции, который опосредует активацию TGFβ-восприимчивых генов, с целью определить, какие клетки в микроокружении опухоли могут отвечать на активированный TGFβ1.

[924] Неожиданно оказалось, что в опухолях от мышей, обработанных антителом к PD-1, и контрольных мышей, окрашивание pSmad3 в значительной степени ограничивалось ядрами эндотелия сосудов опухоли, и этот сигнал значительно уменьшался при обработке Ab6-mIgG (фиг. **30F**).

[925] Для дальнейшего изучения значимости перисосудистой передачи сигналов с участием TGFβ совместно окрашивали CD8+ Т-клетки и CD31+ эндотелий сосудов. CD8+ Т клетки, по-видимому, обогащены в областях, прилегающих к кровеносным сосудам CD31+ опухоли (фиг. **30F** и **30G**). Это наблюдение повышает вероятность того, что сосудистая сеть опухоли может выступать в качестве пути миграции Т-клеток. В то время как другие авторы сообщали, что передача сигналов с участием TGFβ ассоциирована с присутствием богатой фибробластами периопухолевой стромы, которая образует барьер для миграции Т-клеток в опухоль, наши предварительные наблюдения предполагают, что дополнительный TGFβ1-зависимый сосудистый барьер также может играть важную роль в предупреждении миграции CD8+ Т-клеток в опухоль.

Пример 8: Развитие устойчивого противоопухолевого адаптивного иммунного ответа памяти у пациентов с полным ответом на терапию к антителу к PD1/Ab3 и антителу PD1/Ab6 в опухолях MBT-2, Cloudman S91 и EMT-6

1. Противоопухолевая память в опухоли MBT-2

[926] Для определения того, был ли сформирован сильный и устойчивый адаптивный иммунный ответ у пациентов с полным ответом на терапию, которые ранее устраняли опухоли MBT2, проводили эксперимент с повторной провокацией опухоли.

Способы

[927] Самкам мышей C3H/HeN в возрасте 8-12 недель имплантировали подкожно в бок 5×10^5 опухолевых клеток MBT2. Когда опухоли достигали среднего размера 40-80 $мм^3$, животных рандомизировали на группы обработки для начала обработки. Начальный средний объем опухоли был одинаковым во всех группах. Антитело к PD1 (RMP1-14) вводили два раза в неделю, i.p., в дозе 10 мг/кг; Ab3 вводили один раз в неделю в дозе 10 мг/кг или 30 мг/кг, и Ab6 вводили в дозе 3 мг/кг или 10 мг/кг в течение 5 недель. Через 5 недель животных во всех группах антитела к PD1/Ab3 и антитела к PD1/Ab6, с объемами опухоли менее 13,5 $мм^3$ в течение по меньшей мере 3 последовательных измерений, считали «полностью ответившими на терапию (CR)». Измерения проводили два раза в неделю. Среди мышей, получавших одно антитело к PD1, такие пациенты с полным ответом отсутствовали. Для эксперимента с повторной провокацией животные-пациенты с полным ответом не имели никаких измеримых опухолей (например, 0 $мм^3$). За этими полностью ответившими на терапию наблюдали (например, в состоянии «покоя») в течение 7 недель без введения препаратов (период «вымывания»), чтобы обеспечить вымывание ранее вводимых соединений. По истечении 7 недель субъектам с полным ответом на терапию и сопоставимым по возрасту наивным контрольным животным вводили подкожно 5×10^5

опухолевых клеток MBT2 в контралатеральный бок. За животными наблюдали в течение 25 дней или до тех пор, пока объем опухоли не превышал 1200 мм^3, в зависимости от того, что наступало раньше. Конечную точку определяли как объем опухоли 1200 мм^3. По достижении конечной точки животных умерщвляли.

Результаты

[928] Когда субъектам с полным ответом на терапию из исследования эффективности подкожно повторно имплантировали клетки MBT-2 в бок, контралатеральный исходной имплантации, без дальнейшей обработки не наблюдали заметного роста опухоли ни у одной из мышей-пациентов с полным ответом на терапию, тогда как у всех мышей в контрольной группе мышей сопоставимого возраста, наивных в отношении опухоли, в течение трех недель после имплантации развились измеримые опухоли (фиг. **15**).

[929] Более конкретно, модели повторной провокации опухоли являются средством демонстрации иммунологической памяти и наблюдения за метастазами или рецидивом опухоли. В этих случаях субъектам с полным ответом на терапию (животным, достигшим полной регрессии опухоли в ответ на обработку) повторно имплантировали опухолевые клетки и сравнивали рост с наивными мышами сопоставимого возраста. Появление опухоли у наивных животных составляло 100% (12/12) к 25-му дню (фиг. **15**), при этом ряд животных достигали критериев конечной точки. Пациенты с полным ответом из исследования на фиг. **13A** и **13B**, которым повторно вводили клетки MBT2, как описано выше, не имели обнаруживаемых опухолей к концу исследования (в совокупности 0/9 пациентов с полным ответом на терапию), демонстрируя, что 100% пациентов с полным ответом на терапию сохраняют устойчивую иммунную память к повторной провокации опухоли MBT2. Эти результаты указывают на то, что у животных, перенесших опухоль, возник устойчивый и сильный ответ памяти на опухолевые антигены, и позволяют предположить, что устранение опухоли при первоначальном воздействии было связано с адаптивным иммунным ответом. Этот адаптивный иммунный ответ является достаточным для разрушения опухолевых клеток, предупреждения образования опухоли и предполагает продолжающееся подавление метастазов или рецидива опухоли у этих животных. Кроме того, это демонстрирует, что ингибирование TGFβ1 во время первичного иммунного ответа не препятствует развитию популяций лимфоцитов памяти.

[930] Эти результаты повторной провокации на опухолевой модели MBT-2 указывают на то, что комбинированное ингибирование TGFβ1 и PD-1 является достаточным для установления устойчивой и сильной противоопухолевой иммунологической памяти у этих животных.

2. Устойчивые противоопухолевые эффекты в CloudmanS91

[931] Примечательно, что в то время как несколько мышей с опухолью CloudmanS91 в группах комбинации антитела к PD-1/Ab6 испытали полный ответ, у некоторых животных сохранялась небольшая, но стабильная остаточная масса опухоли в течение оставшегося периода обработки. Предпринимали попытки обобщить данные о повторной провокации опухоли в этой модели, как и в MBT-2. Однако скорость взятия опухоли в этой модели варьировалась, что делало этот анализ более сложным. Вместо этого прекращали обработку и наблюдали за животными в течение нескольких недель.

[932] Через шесть недель после прекращения обработки у мышей, у которых на момент прекращения лечения не было опухоли, опухоль по-прежнему отсутствовала. Поддающиеся измерению опухоли при прекращении введении препаратов давали смешанные ответы, многие из которых исчезали, но немногие оставались стабильными или возрастали (фиг. **11D**). Эти данные подчеркивают важность продолжения обработки до достижения полного исчезновения опухоли (также см. пример 5).

3. Устойчивые противоопухолевые эффекты в EMT-6

[933] Неожиданным образом наблюдали аналогичные ответы на комбинацию антителом PD-1/Ab6-mIgG1 в модели карциномы молочной железы EMT-6, с 50% частотой полного ответа после комбинированной обработки и значительным преимуществом в отношении выживаемости по сравнению с антителом к PD-1 (фиг. **34A** и **34C**). В отличие от MBT-2 и CloudmanS91, в которых TGFβ1 представляет собой преимущественно экспрессируемую изоформу, EMT6 экспрессирует аналогичные уровни TGFβ1 и TGFβ3 как на уровне РНК, так и на уровне белка. Эта комбинация обработки была более эффективной, чем ингибирование антителом к PD-1/антителом ко всем формам TGFβ, что позволяет предположить, что даже в присутствии нескольких изоформ TGFβ TGFβ1 представляет собой основной фактор иммунного исключения и, следовательно, первичной устойчивости. В этой модели останавливали обработку и повторно наблюдали, что через шесть недель после прекращения введения препаратов у пациентов с полным ответом на терапию по-прежнему отсутствовали опухоли, что снова демонстрирует устойчивость ответа (фиг. **34C**, справа).

Пример 9: Скрининг, методология отбора и характеристика антител

[934] Учитывая высокую последовательность и структурное сходство между зрелым фактором роста TGFβ1 и его близкородственными представителями семейства, TGFβ2 и TGFβ3, пришли к выводу, что создание селективных и достаточно высокоаффинных ингибиторов на основе антител, нацеленных на эту активную форму

фактора роста TGFβ1, окажется сложным. Недавно опубликованные данные о латентной структуре TGFβ1 и механических аспектах его активации посредством взаимодействия с определенными интегринами указали на возможность нацеливания на продомен в латентных комплексах TGFβ1, направленных на предупреждение активации латентных комплексов в качестве механизма действия.

[935] Достижение селективности изоформ как в связывании, так и в ингибировании активации могло бы иметь преимущество более низкого сходства последовательностей продоменов представителей семейства, которые ограничивают и делают неактивными соответствующие гомодимеры фактора роста. Дополнительным ключевым фактором для идентификации селективного ингибитора активации TGFβ1 является тот факт, что латентный TGFβ1 собирается в связанные дисульфидными связями большие латентные комплексы (LLC), которые позволяют откладывать комплексы неактивных факторов роста либо на внеклеточный матрикс, либо их образование на поверхности клетки. Учитывая вероятность того, что в микроокружении опухоли могут экспрессироваться несколько TGFβ1 LLC, анализировали данные RNAseq на основе TCGA. По сути все типы опухолей демонстрируют доказательства экспрессии четырех proTGFβ1-презентирующих молекул, LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33 (фиг. **20E**). Поэтому стремились идентифицировать специфические антитела, которые будут связывать и ингибировать активацию латентного TGFβ1 во всех этих локальных контекстах.

[936] Растворимые мышиные и человеческие формы каждого LLC TGFβ1 конструировали, экспрессировали, очищали, характеризовали и использовали для этапов положительного отбора в тщательно разработанном скрининге библиотеки дисплея наивных человеческих антител на основе дрожжей. Чтобы гарантировать идентификацию селективных латентных связывающих TGFβ1 соединений, не входящие в комплексы LLC-презентирующие молекулы также использовали на этапах отрицательного отбора.

[937] Родительское антитело идентифицировали путем отбора библиотеки наивных полностью человеческих антител IgG на основе дрожжей с использованием человеческих и мышиных форм LLC TGFβ1 (LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1 и GARP-proTGFβ1) в качестве антигенов положительного отбора и контр-отбора в отношении человеческих и мышиных LLC-презентирующих молекул (LTBP1, LTBP3 и GARP). Отбор представлял собой многоэтапный процесс, включающий два раунда сортировки клеток с помощью магнитных гранул (MACS) и несколько последующих раундов сортировки клеток, активируемых флуоресценцией (FACS). Раунды MACS включали предварительную очистку (для удаления неспецифических связывающих соединений), инкубацию с биотинилированным антигеном, промывку, элюцию и амплификацию дрожжей. Раунды

отбора FACS включали инкубацию с биотинилированным антигеном, промывку и отбор связывающей (для положительного отбора) или несвязывающей (для отрицательного отбора или отмены отбора) популяции с помощью проточной цитометрии с последующей амплификацией выбранных дрожжей путем выращивания в соответствующей среде для росте дрожжей. Все виды отбора выполняли в фазе раствора.

[938] Несколько сотен уникальных антител экспрессировали в виде полноразмерных моноклональных антител IgG1agly (агликозилированный Fc) человека. Затем эти антитела характеризовали с помощью биослойной интерферометрии для определения их способности связывать человеческие и мышиные LTBP1-proTGFβ1, LTBP3-proTGFβ1 и GARP-proTGFβ1. Антитела, которые связываются с этими LLC TGFβ1, исследовали и ранжировали в анализах клеточного скрининга активности (анализы LTBP-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1). Ингибирующие антитела экспрессировали рекомбинантно с человеческим Fc IgG4sdk (шарнир, стабилизированный мутацией S228P; Angal, 1993), и их ингибирующую активность исследовали в анализах интегрин-опосредованной активации TGFβ1 (анализы LTBP-proTGFβ1, GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1; см. пример 2). Некоторые антитела были способны значительно ингибировать proTGFβ1 в анализе репортерных клеток. Антитело Ab4 выбирали в качестве ведущего антитела для созревания аффинности на основании его способности связывать комплексы proTGFβ1 человека и мыши и ингибировать опосредованную интегрином активацию всех LLC proTGFβ1 человека и мыши.

[939] Созревание аффинности Ab4 проводили в два этапа с использованием двух различных стратегий конструирования антител. На первом этапе создавали библиотеку молекул антител, в которой исходную CDRH3 объединяли с предварительно созданной библиотекой антител с вариантами CDRH1 и CDRH2 (шаффлинг H1/H2). Эту библиотеку выбирали для связывания с комплексами proTGFβ1 человека и мыши. Наиболее сильные связывающие соединения из этой фазы кампании по созреванию аффинности затем продвигали во вторую фазу созревания аффинности, при этом CDR3 тяжелой цепи родительской молекулы подвергали мутагенезу с использованием подхода «прогулка димера праймеров» (мутация олиго H3), а библиотеку генерируемых вариантов отбирали для связывания с комплексами proTGFβ1 человека и мыши.

[940] В общей сложности 14 антител, представляющих оптимизированные по аффинности потомки ведущего антитела Ab4 из обеих стадий созревания аффинности, повторно исследовали в отношении связывания антигена и ингибирования латентных LLC TGFβ1. Ab6 выбирали благодаря его высокой аффинности в отношении всех четырех LLC

латентных TGFβ1, перекрестной реактивности с белками мышей, крыс и яванских макаков, а также повышенной эффективности в клеточных анализах.

[941] Для дополнительной характеристики связывающих свойств Ab6, активности связывания in vitro измеряли в анализе MSD-SET. Подтвердили, что Ab6 является селективным в отношении латентных комплексов TGFβ1 (см. фиг. **33A**); значимого связывания с латентным TGFβ2 или латентным TGFβ3 комплексами не обнаружили. Аналогичным образом, связывания с самим активным (зрелым) фактором роста TGFβ1, который не ассоциирован с продоменом, не обнаружили. Как продемонстрировано ниже, Ab6 связывается с высокой аффинностью со всеми большими латентными комплексами TGFβ1 (т.е., презентирующая молекула + proTGFβ1). Кроме того, было продемонстрировано, что Ab6 обладает необходимой межвидовой перекрестной реактивностью; оно распознает и связывается с аналогами крысы и яванского макака с высокой аффинностью.

Таблица 21. Межвидовая специфичность Ab6

Большой латентный комплекс	**Человек K_D (пМ)**	**Мышь K_D (пМ)**	**Крыса K_D (пМ)**	**Яванский макак K_D (пМ)**
LTBP1-proTGFβ1	**18 ± 0**	**24 ± 0**	**35 ± 2**	**39 ± 2**
LTBP3-proTGFβ1	**29 ± 3**	**22 ± 0**	**н.о.**	**н.о.**
GARP-proTGFβ1	**27 ± 2**	**21 ± 3**	**н.о.**	**н.о.**
LRRC33-proTGFβ1	**63 ± 0**	**48 ± 0**	**86 ± 8**	**93 ± 10**

[942] Для исследования способности Ab6 ингибировать активацию латентного TGFβ1 интегринами, разрабатывали серию клеточных анализов активации, которые соответствуют каждому из контекстов LLC, которые обеспечивают презентацию и активацию TGFβ1. Клетки глиобластомы человека LN229 экспрессируют интегрины αVβ8, которые могут активировать латентные комплексы TGFβ1. Эти клетки также эндогенно экспрессируют LTBP1 и LTBP3 (как измерено с помощью qPCR), которые при трансфекции плазмидой, кодирующей TGFβ1, обеспечивают продуцирование и отложение этих LLC TGFβ1 (LTBP1-proTGFβ1 и LTBP3-proTGFβ1) во внеклеточный матрикс. Для получения ассоциированных с клетками GARP- или LRRC33-содержащих LLC TGFβ1 (GARP-proTGFβ1 и LRRC33-proTGFβ1) клетки LN229 (которые не экспрессируют эти гены, с помощью qPCR) котрансфицировали экспрессирующими конструкциями, кодирующими

одну из этих презентирующих молекулы вместе с конструкцией экспрессии TGFβ1. После отложения во внеклеточный матрикс или выработки на клеточной поверхности клеток LN229, LLC TGFβ1 можно затем активировать интегрином αVβ8, экспрессируемым теми же клетками. Зрелый (активный) фактор роста TGFβ1, который высвобождается из латентного комплекса посредством активации интегрина, затем может свободно взаимодействовать со своим когнатным рецептором на кокультивируемых клетках, сконструированных с промотором-репортером CAGA12-люциферазы, который позволяет измерять активность фактора роста.

[943] Все LLC TGFβ1 легко активировали в вышеупомянутых условиях анализа. Котрансфекция GARP или LRRC33 в клетки LN229, экспрессирующие латентный TGFβ1, приводила к значительно более высокому сигналу TGFβ, что согласуется с образованием и активацией LLC TGFβ1 на поверхности клетки и опережает эндогенные LTBP. Ab6 ингибировало активацию всех комплексов в зависимости от концентрации со значениями IC50 от 1,15 до 1,42 нМ. Эффективность ингибирования комплексов TGFβ1 мыши была аналогичной, что соответствовало видовой перекрестной реактивности Ab6. В соответствии с отсутствием значительного связывания Ab6 с комплексом LTBP1-TGFβ3, в идентично разработанном анализе не наблюдали ингибирования интегрин-опосредованного комплекса активации LLC LTBP-TGFβ3, что демонстрирует селективность ингибирования активации TGFβ1 (фиг. **33B**).

[944] Примечательно, что Ab6 также ингибировало активацию латентного TGFβ1 калликреином плазмы крови человека и плазмином (см. фиг. **5A** и **5B**), что указывает на то, что это антитело может ингибировать множественные предполагаемые механизмы активации.

[945] Для дополнительной оценки способности Ab6 ингибировать биологически значимое последствие активации TGFβ1, оценивали способность этого антитела ингибировать ключевую супрессорную активность первичных Treg-клеток человека. Отсортированные $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}$ Treg-клетки повышали экспрессию на поверхности LLC TGFβ1-GARP при стимуляции Т-клеточного рецептора (фиг. **26A**). Эти активированные Treg-клетки подавляли пролиферацию аутологичных эффекторных CD4 Т-клеток, и Ab6 блокировало эту супрессорную активность Treg при таких низких концентрациях, как 1 мкг/мл (фиг. **26B**). Эти результаты согласуются с предыдущими наблюдениями о том, что Treg-клетки используют передачу сигналов с участием TGFβ для подавления Т-клеток.

Пример 10: Картирование эпитопа для определения области связывания Ab5, Ab6 и Ab3 в комплексе proTGFβ

[946] Для получения первоначального представления о механизме ингибирующего действия для селективных в отношении изоформы ингибиторов активации TGFβ1, выполняли масс-спектрометрический анализ водородно-дейтериевого обмена (H/DX-MS) для выявления возможных областей взаимодействия латентного TGFβ1 с антителом. Масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS) представляет собой широко используемую методику исследования конформации белков в растворе. Методология HDX-MS описана в работе Wei et al., Drug Discov Today. 2014 January; 19(1): 95–102, включенной в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Вкратце, HDX-MS основывается на обмене амидных атомов водорода каркаса белка с дейтерием в растворе. Амидные атомы водорода каркаса, участвующие в слабых водородных связях или расположенные на поверхности белка, могут быстро обмениваться, в то время как атомы водорода, находящиеся внутри или участвующие в стабилизации водородных связей, обмениваются медленнее. Измеряя уровни HDX амидных атомов водорода каркаса, можно получать информацию о динамике и конформации белка.

[947] Латентный TGFβ1 (15 мкМ) и proTGFβ1/Fab Ab (молярное соотношение 1:3) получали в буфере для образцов (20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7,5). В недейтерированных экспериментах каждый образец смешивали с буфером для образца (1:15, об./об.) при комнатной температуре, затем смешивали в соотношении 1:1 (об./об.) с буфером для гашения (100 мМ фосфат натрия, 4 М гуанидин HCl, 0,5 М TCEP) при 0 °C. Погашенные образцы немедленно вводили в систему nanoACQUITY UPLC™ с технологией HDX (Waters Corp., Милфорд, Массачусетс, США) для расщепления пепсином на колонке. Элюент направляли в масс-спектрометр SYNAPT® G2 HDMS (Waters Corp., Милфорд, Массачусетс, США) для анализа в режиме MSE. Для экспериментов по H/D обмену каждый образец смешивали с буфером для мечения (20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl в оксиде дейтерия, pD 7,5) (1:15, об./об.) для запуска реакций мечения при 25 °C. Пять аликвот каждого образца метили через различные интервалы времени: 10 секунд, 1 минуту, 10 минут, 1 час и 2 часа. В конце каждой временной точки мечения реакцию гасили добавлением буфера для гашения 1:1 (об./об.), и гашеные образцы вводили в систему Waters H/DX-MS для анализа. Между каждым анализом образцов проводили чистую холостую пробу, вводя промывочный буфер пепсина (1,5 М гуанидин HCl, 4% ацетонитрил, 0,8% муравьиная кислота) в систему H/DX-MS.

[948] Точную массу и индуцированную столкновением диссоциацию в независимом от данных режиме сбора данных (MSE) и программное обеспечение ProteinLynx Global Server (PLGS) 3.0 (Waters Corp., Милфорд, Массачусетс) использовали для определения пептидов в образцах недейтерированного белка, проанализированных в той же самой система UPLC-ESI-QToF, используемой для экспериментов H/DX-MS. Пептические пептиды, полученные из PLGS, импортировали в DynamX 3.0 (Waters Corp., Милфорд, Массачусетс) с пороговыми значениями качества пептидов интенсивности сигнала MS1 $\geq$ 1000 и максимальной ошибкой массы 1 ч./млн. Автоматизированные результаты проверяли вручную, чтобы гарантировать, что соответствующие распределения m/z и изотопов при различных состояниях заряда были должным образом отнесены к соответствующему пептическому пептиду. DynamX 3.0 использовали для создания графика относительного включения дейтерия и тепловой карты H/DX для каждого пептида. Относительное включение дейтерия в каждый пептид определяли путем вычитания средневзвешенной массы центроида изотопного распределения недейтерированного контрольного образца из средневзвешенной массы центроида изотопного распределения меченных дейтерием образцов в каждый момент времени мечения. Все сравнения проводили в идентичных экспериментальных условиях, что исключало необходимость поправки на обратный обмен при определении включения дейтерия. Таким образом, уровни H/D обмена указаны как относительные. Фракционное относительное поглощение дейтерия рассчитывали путем деления относительного поглощения дейтерия каждым пептидом на его теоретическое максимальное поглощение. Все эксперименты H/DX-MS выполняли в двух повторностях, и 98% доверительный интервал для неопределенности среднего относительного поглощения дейтерия рассчитывали, как описано. Различия в поглощении дейтерия между несвязанным и Fab-связанным латентным TGFβ1, превышающие 0,5 Да, считали значимыми.

[949] HDX-MS проводили для определения области связывания Ab5 и Ab6 в комплексе proTGFβ. В HDX-MS области антигена, которые прочно связаны антителом, защищены от протонного обмена в результате белок-белкового взаимодействия, в то время как области, которые подвергаются воздействию растворителя, могут легко подвергаться обмену протонами. На основании этого идентифицировали связывающие области антигена.

[950] Тепловая карта изображает, что связывание Ab5 Fab приводит к защите HDX в областях (область 1 и область 2) ProTGFβ1 (фиг. **16**). На фиг. **17** изображена структура комплекса proTGFβ1, наложенного на HDX-защищенные области, связанные Ab5. Примечательно, что HDX-MS продемонстрировал, что Ab5 потенциально связывается с уникальным эпитопом в области LAP/фактора роста ProTGFβ1.

[951] Аналогичные исследования HDX проводили для идентификации областей связывания, участвующих в связывании Ab6 с proTGFβ1. Достигали высокого покрытия пептидами ~ 90%. Анализ выявил три области на латентном TGFβ1, которые были защищены от обмена дейтерия связыванием Fab Ab6. На тепловой карте, представленной на фиг. **18A**, изображены определенные области ProTGFβ1, на которые оказывает влияние взаимодействие Ab6 с антигеном. Эти области антигена отмечены красными прямоугольниками, показанными на фигуре. На фиг. **18B** изображена структура комплекса proTGFβ1, а области, идентифицированные на фиг. **18A,** помечены соответственно для демонстрации пространственного соотношения этих областей в комплексе proTGFβ1.

[952] Как изображено на фиг. **18A**, защищенная область, отмеченная звездочкой (*), оказалась такой же, как и область 1, идентифицированная для Ab5. Защищенная область, отмеченная двойной звездочкой (**), оказалась подмножеством области 2, идентифицированной для Ab5. Эти данные предполагают, что предпочтительные антитела, которые проявляют предпочтительную ингибирующую активность, могут связывать эпитоп, который содержит часть лассо латентности (латентной петли) латентного комплекса. Данные также предполагают, что такой эпитоп может представлять собой комбинаторный эпитоп, который образован частью лассо латентности и частью домена фактора роста, который может эффективно «зажимать» фактор роста в заблокированном состоянии, тем самым предупреждая его высвобождение.

[953] Статистический анализ выявил три области связывания на proTGFβ1, которые были сильно значительно от обмена дейтерия связыванием Fab Ab6 (фиг. **19A**). Область 1 находились внутри латентного продомена TGFβ1, тогда как области 2 и 3 картировали с фактором роста TGFβ1. Интересно, что область 1 в значительной степени охватывала лассо латентности и содержала сайты протеолитического расщепления как для плазминовых, так и для калликреиновых протеаз; защита этой области согласуется с наблюдением того, что Ab6 ингибирует калликреин- и плазмин-опосредованную активацию латентного TGFβ1 (фиг. **5A** и **5B**). Также важно повторить, что Ab6 не связывается ни с одним из трех димеров фактора роста TGFβ в свободной форме (например, не находится в ассоциации с продоменом), что означает, что любые потенциальные взаимодействия с сайтами в домене фактора роста зависят от взаимодействия продоменов. Более того, Ab6 и интегрин αVβ6 могут связываться с латентным TGFβ1 одновременно. Это наблюдение предполагает аллостерический механизм ингибирования интегрин-зависимой активации TGFβ1, поскольку связывающие области антитела расположены дистальнее триггерной петли в продомене TGFβ1, которая несет сайт узнавания интегрина (RGD; фиг. **19B**). Кроме того, выравнивание последовательностей предполагаемых эпитопных областей 1-3 (в частности,

областей 1 и 2) выявило значительное расхождение последовательностей трех изоформ TGFβ, что, вероятно, объясняет наблюдаемую селективность Ab6 в отношении proTGFβ1 по сравнению с комплексами proTGFβ2 и proTGFβ3 (фиг. **19B**).

Пример 11: Биоинформационный анализ относительной экспрессии TGFB1, TGFB2 и TGFB3

[954] Предыдущие анализы образцов опухолей человека показали, что передача сигналов с участием TGFβ является важным фактором первичной устойчивости к СВТ (Hugo et al. 2016). Одно из этих исследований показало, что экспрессия гена TGFB1 при уротелиальном раке была одним из наиболее успешных генов пути с участием TGFβ, ассоциированных с неответившими на терапию антителом к PD-L1, что позволяет предположить, что активность этой изоформы может контролировать передачу сигналов с участием TGFβ.

[955] Для оценки экспрессии изоформ TGFβ в раковых опухолях, изучали данные об экспрессии генов (RNAseq) из общедоступных наборов данных. Используя общедоступный инструмент онлайн-интерфейса (Firebrowse) для изучения экспрессии изоформ TGFβ (TGFB1, TGFB2 и TGFB3) в Атласе генома рака (TCGA), сначала исследовали дифференциальную экспрессию РНК, кодирующую изоформы TGFβ, как в нормальной, так и в раковой ткани. Экспрессию мРНК TGFB1, TGFB2 и TGFB3 оценивали в популяциях типов рака человека, а также в отдельных опухолях. Отбирали наборы данных RNAseq всех опухолей в базе данных TCGA, для которых использовали компараторы нормальных тканей, и исследовали экспрессию генов TGFB1, TGFB2 и TGFB3 (фиг. **20A**). Данные из интерфейса Firebrowse представлены как log2 считываний на миллион килобаз (RPKM).

[956] Эти данные предполагают, что в большинстве типов опухолей (серый цвет) TGFB1 является наиболее широко экспрессируемым транскриптом изоформ TGFβ, при этом значения log2(RPKM), как правило, находятся в диапазоне 4-6, по сравнению с 0-2 для TGFB2 и 2-4 для TGFB3. Также отмечали, что в некоторых типах опухолей средний уровень экспрессии TGFB1 и TGFB3 повышен по сравнению с нормальными образцами компаратора (черный цвет), предполагая, что повышенная экспрессия этих изоформ TGFβ может быть ассоциирована с раковыми клетками. Вследствие потенциальной роли передачи сигналов с участием TGFβ в подавлении иммунной системы хозяина в микроокружении рака, было интересно отметить, что транскрипты TGFB1 были повышены в типах рака, для которых одобрены виды лечения антителом к PD-1 или антителом к PDL1 – эти показания помечены серым цветом на фиг. **20A**.

[957] Следует обратить внимание, что хотя RPKM > 1, как правило, считается минимальным значением, ассоциированным с биологически значимой экспрессией генов (Hebenstreit et al., 2011; Wagner et al., 2013), однако для последующих анализов использовали более строгие ограничения RPKM (или соответствующий показатель FPKM (см. Conesa et al, 2016)) > 10 или > 30, чтобы избежать ложно-положительных результатов. Для сравнения все три из этих пороговых значений указаны на фиг. **20A**.

[958] Большие межквартильные интервалы на фиг. **20A** указывают на значительную вариабельность экспрессии изоформ TGFβ среди отдельных пациентов. Для выявления различных видов рака, при которых по меньшей мере подгруппа популяции пациентов имеет опухоли, которые дифференциально экспрессируют изоформу TGFβ1, данные RNAseq из отдельных образцов опухолей в наборе данных TCGA проанализированы с расчетом количества фрагментов на миллион килобаз (FPKM). RPKM и FPKM приблизительно эквивалентны, хотя FPKM корректирует двойной подсчет считываний на противоположных концах одного и того же транскрипта (Conesa et al., 2016). Образцы опухолей оценивали как положительные в отношении экспрессии TGFβ1, TGFβ2 или TGFβ3, если значение FPKM транскрипта составляло > 30, и рассчитывали долю пациентов (выраженную в%) каждого типа рака, которые экспрессировали каждую изоформу TGFβ (фиг. **20B**).

[959] Сравнительный анализ данных RNAseq из Атласа генома рака (TCGA) показал, что среди трех представителей семейства экспрессия TGF-1 оказалась наиболее распространенной среди большинства типов опухолей. Заметными исключениями являются рак молочной железы, мезотелиома и рак предстательной железы, где экспрессия других представителей семейства, в частности, TGF-3, по меньшей мере в равной степени преобладает по сравнению с TGF-1. Как изображено на фиг. **20B**, большинство типов опухолей демонстрируют значительный процент отдельных образцов, которые являются TGFβ1-положительными, при этом некоторые типы рака, включая острый миелоидный лейкоз, диффузную крупноклеточную В-лимфому и плоскоклеточный рак головы и шеи, экспрессируют TGFβ1 более чем в 80 % от всех образцов опухолей. В соответствии с данными на фиг. **20A**, меньшее количество типов рака являлись положительным в отношении TGFβ2 или TGFβ3, хотя несколько видов рака демонстрировали равный или больший процент образцов опухоли, которые являлись TGFβ3-положительными, включая инвазивную карциному молочной железы, мезотелиому и саркому. Эти данные предполагают, что типы рака могут быть классифицированы по экспрессии изоформы TGFβ, и что такая классификация может быть пригодной при идентификации пациентов,

которые являются кандидатами на лечение ингибиторами, специфическими в отношении изоформы TGFβ.

[960] Для дальнейшего исследования этой гипотезы анализировали данные log2(FPKM) RNAseq для подмножества отдельных образцов опухолей и наносили на тепловую карту (фиг. 20C), устанавливая цветовой порог, отражающий FPKM > 30 как минимальный уровень транскрипта, который должен быть оценен как положительный в отношении изоформы TGFβ. Упорядочение экспрессии мРНК TGF-1 в отдельных образцах опухолей среди семи типов опухолей, одобренных для лечения CBT, подтвердило более высокую и более частую экспрессию мРНК TGF-1 по сравнению с TGF-2 и TGF-3, опять же за заметным исключением карциномы молочной железы. Эти и ранее опубликованные наблюдения при уротелиальном раке предполагают, что активность пути с участием TGFβ, вероятно, обусловлена активацией TGFβ1 в большинстве опухолей человека.

[961] Каждый образец представлен в виде одной строки на тепловой карте, а образцы упорядочены по уровню экспрессии TGFβ1 (самые высокие уровни экспрессии вверху). В соответствии с анализом на фиг. **20B**, значительное количество образцов каждого типа рака являлись положительными в отношении экспрессии TGFB1. Однако это представление также подчеркивает тот факт, что многие опухоли экспрессируют только транскрипты TGFB1, особенно при карциноме пищевода, уротелии мочевого пузыря, аденокарциноме легкого и различных типах злокачественной меланомы кожи. Интересно, что такое смещение TGFB1 характерно не для всех видов рака, так как образцы инвазивной карциномы молочной железы демонстрируют гораздо большее количество образцов, которые являются TGFB3-положительными, чем TGFB1-положительными. Тем не менее, этот анализ указывает на то, что изоформа β1 является преобладающим и в большинстве случаев единственным представителем семейства TGFβ, присутствующим в опухолях большого числа пациентов, больных раком. В совокупности с данными, свидетельствующими о том, что передача сигналов с участием TGFβ играет важную роль в иммуносупрессии в микроокружении рака, эти данные также указывают на пригодность TGFβ1-специфического ингибирования при лечении этих опухолей.

[962] Для идентификации мышиных моделей, на которых можно исследовать эффективность TGFβ1-специфического ингибирования в качестве противоопухолевого терапевтического средства, анализировали экспрессию изоформ TGFβ в данных RNAseq из различных линий клеток, используемых в моделях сингенных мышиных опухолей. Для этого анализа создавали два представления данных. Сначала создавали тепловую карту значений log2(FPKM) для опухолей, полученных из каждой клеточной линии (фиг. **20D**, слева). Поскольку этот анализ проводили для выявления сингенных моделей, которые

воспроизводили бы человеческие опухоли (преимущественно TGFB1), в первую очередь стремились избежать ложноотрицательных результатов, и устанавливали «положительный» порог на FPKM > 1, значительно ниже, чем в представлениях на фиг. **20B** и **20C**.

[963] Как следует из представления данных на фиг. **20D** (слева), ряд сингенных опухолей, включая MC-38, 4T-1 и EMT6, как правило, экспрессируют значительные уровни как TGFβ1, так и TGFβ3. В отличие от этого, модели A20 и EL4 почти полностью экспрессируют TGFβ1, а опухоли S91 и P815 демонстрируют значительное смещение в отношении экспрессии TGFB1.

[964] Для дополнительной оценки дифференциальной экспрессии TGFB1 по сравнению с TGFB2 и/или TGFB3, вычисляли minΔTGFB1, определенный как меньшее значение $\log2(FPKM_{TGFB1}) - \log2(FPKM_{TGFB2})$ или $\log2(FPKM_{TGFB1}) - \log2(FPKM_{TGFB3})$. MinΔTGFB1 для каждой модели изображен в виде тепловой карты на фиг. **20D** (справа), и подчеркивает вывод из фиг. **20D** (слева) о том, что сингенные опухоли из клеточных линий A20, EL4, S91 и/или P815 могут представлять собой отличные модели для исследования эффективности TGFβ1-специфических ингибиторов.

[965] Для дополнительного подтверждения связи экспрессии TGFβ1 с первичной устойчивостью к CBT по сравнению с TGFβ2 или TGFβ3, коррелировали экспрессию изоформ с врожденной сигнатурой устойчивости к PD-1 («IPRES») (Hugo et al., *Cell.* 2016 Mar 24;165(1):35-44). Вкратце, IPRES представляет собой набор из 26 транскриптомных сигнатур, которые в совокупности указывают на устойчивость опухоли к терапии антителами к PD-1. Сигнатура IPRES указывает на повышенную экспрессию генов, участвующих в регуляции мезенхимального перехода, клеточной адгезии, ремоделирования ECM, ангиогенеза и заживления ран. Для семи одобренных для лечения CBT типов опухолей обнаруживали более устойчивую положительную и значимую корреляцию между уровнями мРНК TGFG1 и оценкой IPRES, чем экспрессия мРНК двух других изоформ TGFβ (фиг. **37A**). В совокупности, эти данные предполагают, что селективное ингибирование активности TGFβ1 может преодолеть первичную устойчивость к CBT.

[966] Анализ вариации генов (GSVA) транскрипционной сигнатуры IPRES (врожденная устойчивость к PD-1) для типов опухолей, определенных TCGA, с одобренными видами лечения CBT коррелирует (коэффициент Пирсона) наиболее сильно и значительно с содержанием РНК TGFβ1 с пороговым значением FPKM ≥ 30 для наличия экспрессии. В совокупности, эти данные предполагают, что селективное ингибирование активности TGFβ1 может преодолеть первичную устойчивость к CBT.

[967] Анализ вариации генов (GSVA) транскрипционной сигнатуры IPRES (врожденная устойчивость к PD-1) для типов опухолей, определенных TCGA, с одобренными видами лечения CBT коррелирует (коэффициент Пирсона) наиболее сильно и значительно с содержанием РНК TGFβ1 с пороговым значением FPKM ≥ 30 для наличия экспрессии.

[968] Для дальнейшей оценки корреляции экспрессии TGFβ1 с устойчивостью к CBT, множество РНК TGFβ1 сравнивали с анализом вариации набора генов (GSVA) транскрипционной сигнатуры пути с участием TGFβ Plasari (врожденная устойчивость к PD-1) в опухолях определенных TCGA с одобренные видами лечения CDT. Набор генов Plasari получали с веб-портала mSigDB (http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp), и расчет набора генов определяли с использованием пакета GSVA в R (Hanzelmann et al., *BMC Bioinformatics* 201314:7, 2013; и Liberzon et al., *Bioinformatics*. 2011 Jun 15; 27(12): 1739-1740). Как изображено на фиг. **37B**, GSVA коррелировал (коэффициент Пирсона) наиболее сильно и достоверно с содержанием РНК TGFβ1, с пороговым значением FPKM ≥ 30 для наличия экспрессии.

[969] Эти данные предполагают, что активность пути с участием TGFβ, вероятно, обусловлена активацией TGFβ1 в большинстве опухолей человека.

[970] Для описанного выше биоинформационного анализа использовали следующие ресурсы:

данные экспрессии изоформ TGFBeta на основе TCGA загружали из ресурса наборов данных браузера UCSC Xena (https://xenabrowser.net/datapages/). Пороговое значение экспрессии для определения высокой экспрессии устанавливали путем исследования распределения значений FPKM данных изоформ TGFBeta. Тепловые карты и диаграммы рассеяния создавали с помощью GraphPad Prism. Набор генов Plasari получали с веб-портала mSigDB (http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp), и расчет набора генов определяли с использованием пакета GSVA в R.

Пример 12: TGFβ1-селективные ингибиторы демонстрируют сниженную токсичность по сравнению с ингибитором ALK5 киназы LY2109761 и антителом ко всем формам TGFβ в исследованиях безопасности/токсичности

[971] Для оценки потенциальной токсичности Ab3 и Ab6 in vivo по сравнению с низкомолекулярным ингибитором киназы рецептора TGF-β I типа (ALK5) LY2109761 и антителом ко всем формам TGFβ (hIgG4; нейтрализующее) проводили исследования безопасности/токсичности у крыс. Крысу выбирали, поскольку выбор этого вида для этого исследования безопасности был основан на предыдущих сообщениях о том, что крысы

более восприимчивы к ингибированию TGFβ по сравнению с мышами. Аналогичную токсичность, наблюдаемую у крыс, наблюдали также у других видов млекопитающих, таких как собаки, отличные от человека приматы, а также у людей.

[972] Вкратце, самкам крыс Fisher344 (фиг. **21A** и **21B**) или крыс Sprague Dawly (фиг. **21C**) вводили либо Ab3 в дозе 3 мг/кг (1 группа, n = 5) или в дозе 30 мг/кг (1 группа, n = 5) или в дозе 100 мг/кг (1 группа, n = 5); Ab6 в дозе 10 мг/кг (1 группа, n = 5), 30 мг/кг (1 группа, n = 5) или 100 мг/кг (1 группа, n = 5); антитело ко всем формам TGFβ в дозе 3 мг/ (1 группа, n = 5), 30 мг/кг (1 группа, n = 5) или 100 мг/кг (1 группа, n = 5); LY2109761 в дозе 200 мг/кг (1 группа, n = 5) или 300 мг/кг (1 группа, n = 5); либо PBS (pH 7,4) контроль-носитель (1 группа, n = 5).

[973] Животным, получавшим антитело ко всем формам TGFβ, введение выполняли однократно внутривенно (в 1-й день) в объеме 10 мл/кг, умерщвляли на 8-й день и проводили вскрытия. Животным, получавшим либо Ab3, либо Ab6, введение проводили внутривенно один раз в неделю в течение 4 недель (на 1-й, 8-й, 15-й и 22-й день) в объеме 10 мл/кг. Животным, получавшим LY2109761, введение проводили через желудочный зонд один раз в день в течение пяти или семи дней. Животных умерщвляли на 29-й день и проводили вскрытия.

[974] Общие клинические наблюдения за животными проводили два раза в день, а наблюдения у клетки проводили после введения препаратов для оценки острой токсичности. Другие выполняемые наблюдения включали оценку потребления пищи и измерение массы тела один раз в неделю. Они также включали клинический патологический анализ (общий анализ крови, химический анализ сыворотки крови и коагуляционный анализ) и анатомический патологический анализ (макроскопический и микроскопический). Полный набор тканей собирали при вскрытии для микроскопической оценки. Ткани консервировали в 10% нейтральном забуференном формалине, обрезали, обрабатывали в стандартном порядке и заливали парафином. Парафиновые блоки микротомировали, а срезы окрашивали гематоксилином и эозином (H&E). В частности, сердце обрезали путем продольного деления пополам по плоскости, перпендикулярной плоскости легочной артерии, для обнажения правого атриовентрикулярного, левого атриовентрикулярного и аортального клапанов. Обе половины отправляли на заливку. Каждую половину сердца заливали парафином поверхностью среза вниз. Блоки разрезали для получения по меньшей мере трех сердечных клапана. Срезы тканей исследовали с помощью световой микроскопии сертифицированным членом American College of Veterinary Pathologists (ACVP).

[975] Как продемонстрировано в таблице 20 и на фиг. **21**, животные, которым вводили ≥3 мг/кг антитела ко всем формам TGFβ, демонстрировали признаки сердечного клапана (т.е., вальвулопатию), аналогичные тем, которые описаны у животных, которым вводили LY2109761. Животные, которым вводили антитело ко всем формам TGFβ в дозе ≥30 мг/кг, демонстрировали признаки предсердий, аналогичные тем, которые описаны у животных, которым вводили LY2109761. Животные, которым вводили антитело ко всем формам TGFβ в дозе 100 мг/кг, демонстрировали признаки миокарда, аналогичные тем, которые описаны у животных, которым вводили LY2109761, и животные, которым вводили антитело ко всем формам TGFβ в дозе 30 мг/кг, имели кровоизлияние в миокард. Одно животное, которому вводили антитело ко всем формам TGFβ в дозе 100 мг/кг, имело умеренный интрамуральный некроз с кровоизлиянием в коронарную артерию, который был ассоциировано с незначительными периваскулярными инфильтратами из смешанных воспалительных клеток. Признаки костей у животных, которым вводили антитело ко всем формам TGFβ и LY2109761, состояли из макроскопической аномальной формы грудины и микроскопической увеличенной толщины гипертрофической зоны в замыкательной пластинке грудины и зоне роста бедренной и большеберцовой кости; эти результаты были более частыми и/или серьезными у животных, которым вводили LY2109761, по сравнению с антителом ко всем формам TGFβ.

Таблица 22. Микроскопические признаки сердца у животных, получавших антитело ко всем формам TGFβ

	Антитело ко всем формам TGFβ			
Уровень дозы (мг/кг/день)	0	3	30	100
Сердце				
Сердечные клапаны				
Вальвулопатия				
Минимальная	0	2	0	0
Слабая	0	2	4	5
Умеренная	0	0	1	0
Предсердие				
Инфильтрат, смешанные клетки				
Минимальный	0	0	1	2
Слабый	0	0	1	1
Гиперплазия, эндотелий				
Минимальная	0	0	3	1
Кровоизлияние				
Минимальное	0	0	1	0
Миокард				
Дегенерация/некроз				
Слабый	0	0	0	2

Кровоизлияние				
Минимальное	0	0	2	1
Слабый	0	0	1	1
Инфильтрат, смешанные клетки, основание				
Слабый	0	0	0	1
Коронарная артерия				
Некроз с кровоизлиянием				
Умеренный	0	0	0	1
Инфильтрат, смешанные клетки, перивасулярный				
Слабый	0	0	0	1

[976] Как изображено на фиг. **21A**, животные, которым вводили антитело ко всем формам TGFβ, проявляли токсичность, аналогичную токсичности, описанной у животных, которым вводили LY2109761, как описано в PCT/US2018/012601, который включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В частности, животные, которым вводили ≥3 мг/кг антитела ко всем формам TGFβ, демонстрировали признаки сердечного клапана (например, вальвулопатию), аналогичные тем, которые описаны у животных, которым вводили LY2109761. Животные, которым вводили антитело ко всем формам TGFβ в дозе ≥30 мг/кг, демонстрировали признаки предсердий, аналогичные тем, которые описаны у животных, которым вводили LY2109761. Животные, которым вводили антитело ко всем формам TGFβ в дозе 100 мг/кг, демонстрировали признаки миокарда, аналогичные тем, которые описаны у животных, которым вводили LY2109761, и животные, которым вводили антитело ко всем формам TGFβ в дозе 30 мг/кг, имели кровоизлияние в миокард. Одно животное, которому вводили антитело ко всем формам TGFβ в дозе 100 мг/кг, имело умеренный интрамуральный некроз с кровоизлиянием в коронарную артерию, который был ассоциировано с незначительными периваскулярными инфильтратами из смешанных воспалительных клеток. Признаки костей у животных, которым вводили антитело ко всем формам TGFβ и LY2109761, состояли из макроскопической аномальной формы грудины и микроскопической увеличенной толщины гипертрофической зоны в замыкательной пластинке грудины и зоне роста бедренной и большеберцовой кости. Последующие исследования с применением LY2109761 и антитела ко всем формам TGFβ, как изображено на фиг. **21B** и **21C**, также демонстрировали аналогичные значения токсичности. Наблюдаемые вальвулопатии сердца у животных, получавших ингибиторы всех форм TGFβ, характеризующиеся утолщением сердечного клапана в результате кровоизлияния, эндотелиальной гиперплазии, смешанного воспалительного клеточного

инфильтрата и/или стромальной гиперплазии, согласуются с ранее опубликованными данными.

[977] В отличие от этого, в отличие от антител ко всем формам TGFβ или животных, которым вводили LY2109761, крысам, которым вводили TGFβ1-селективные ингибиторы, а именно Ab3 или Ab6, уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов (NOAEL) как Ab6, так и Ab3 в этих исследованиях представлял собой дозу 100 мг/кг еженедельно, самую высокую исследуемую дозу. Как изображено на фиг. **21B**, только минимальные или незначительные изменения сердечного клапана наблюдали у небольшого количества животных, получавших Ab3, и эти результаты были сочтены маловероятно связанными с исследуемым препаратом вследствие низкой частоты встречаемости (у животных и количества сердечных клапанов у животного), отсутствия зависимости доза-ответ или корреляция с ней, и/или отсутствия сопутствующих результатов исследования костной ткани. Кроме того, у животных, получавших Ab6, не было обнаружено никаких признаков (фиг. **21C)**.

[978] Фармакокенетический анализ продемонстрировал, что сывороточные концентрации Ab6 достигали 2300 мкг/мл у животных, которым вводили дозу 100 мг/кг в течение 4 недель. Средние сывороточные концентрации Ab6 по окончании исследования (на 29-й день) достигали 2,3 мг/мл для максимальной оцениваемой дозы 100 мг/кг. Эти результаты предполагают, что селективное ингибирование активации TGFβ1, по-видимому, позволяет избежать ключевой ограничивающей дозу токсичности при дозах, значительно превышающих те, которые требуются для терапевтического эффекта, наблюдаемого во множестве моделей in vivo.

[979] Таким образом, животные, получавшие Ab3 или Ab6 во всех исследуемых дозах (3 мг/кг, 30 мг/кг или 100 мг/кг) в течение периода 4 недель у крыс (вид, который, как известно, был восприимчив к ингибированию TGFβ), не демонстрировали токсические эффекты на фоне любого из следующих параметров: дегенерация или некроз миокарда, кровоизлияние в предсердие, кровоизлияние в миокард, кровотечение из клапана, гиперплазия эндотелия клапана, гиперплазия стромы клапана, инфильтраты смешанных воспалительных клеток в сердечных клапанах, минерализация, некроз с кровотечением в коронарной артерии, некроз с воспалением в корне аорты, некроз или инфильтрат воспалительных клеток в кардиомиоцитах и вальвулопатия. Таким образом, обработка специфическими в отношении изоформы ингибиторами активации TGFβ1 неожиданно приводила к значительному улучшению профилей безопасности, например, снижению смертности, снижению кардиотоксичности и снижению показателей костной ткани по

сравнению с обработкой ингибитором всех форм TGFβ (например, ингибитором ALK5 киназы LY2109761 или антителом ко всем формам TGFβ).

[980] Исследование токсичности GLP также проводили у отличных от человека приматов (яванских макаков), для оценки профилей безопасности высокоаффинного селективного ингибитора TGFβ1, Ab6. Протокол включал 4-недельное повторное введение препаратов в дозе 30, 100 и 300 мг/кг в неделю с последующим 4-недельным восстановлением.

[981] Ab6 хорошо переносилось в дозах 30, 100 и 300 мг/кг в неделю. Никаких нежелательных результатов, связанных с Ab6, не отмечали ни в основной, ни в восстанавливающейся когортах. В органах-мишенях, являющихся очагами токсичности, наблюдаемой в случае ингибиторов всех форм TGFβ (например, отсутствие кардиотоксичности, гиперплазии и воспаления, стоматологические и десневые признаки), не обнаруживали никаких признаков, связанных с Ab6.

[982] Концентрации Ab6 в сыворотке крови достигала 15600 мкг/мл после 5 еженедельных доз 300 мг/кг. В конце периода восстановления уровни концентрации Ab6 в сыворотке крови оставались высокими и составляли приблизительно 2000-3000 мкг/мл.

[983] На основании этих данных, NOAEL для Ab6 у яванского макака составлял 300 мг/кг/неделю, что является наивысшей исследованной дозой.

Пример 13: Эффекты комбинации антитела к PD-1/Ab3 на внутриопухолевые иммунные клетки

[984] Предыдущие отчеты исследовали исключение эффекторных Т-клеток из иммуносупрессорных опухолей в доклинических животных моделях.

[985] Однако в этих отчетах не содержалась информация о макрофагах. Для оценки взаимосвязи инфильтрации макрофагов в модели сингенной опухоли с подавленным иммунитетом и эффектов ингибирования TGFβ1 в контексте, проводили иммуногистохимический анализ на образцах опухоли CloudmanS91, обработанных антителом к PD1 и Ab3 в дозе 30 мг/кг из Примера 7 выше (см. фиг. **24A-24D**).

[986] В контрольных срезах опухоли животных, которые не получали комбинацию антитело к PD1/Ab3, обнаруживали некоторые F4/80-положительные клетки, что указывает на то, что опухоль содержит некоторые макрофаги, которые, вероятно, являются так называемыми опухолеассоциированными макрофагами типа M2, или TAM. Для сравнения, в срезах, полученных от животных, которых обрабатывали комбинацией антитело к PD1/Ab3, в опухоли наблюдали заметное повышение количества F4/80-положительных клеток (см. фиг. **24A-24C**). Эта обширная инфильтрация опухоли F4/80-положительными

макрофагами у животных, обработанных антителом к PD-1/Ab3, по сравнению с одним антителом к PD1, предполагает, что комбинированная обработка, но не одно антитело к PD1, вызывало значительную миграцию клеток, предположительно вследствие рекрутинга циркулирующих моноцитов, которые инфильтровали опухоль. Для идентификации фенотипа этих макрофагов антитело к CD163 использовали в качестве маркера макрофагов M2. Как изображено на фиг. **24D**, большинство этих клеток оказались CD163-негативными, что позволяет предположить, что макрофаги, которые подлежали рекрутингу в опухоли в ответ на обработку комбинацией антитело к PD1/Ab3, вероятно, относятся к типу M1, таким образом, противоопухолевому подтипу. Это может указывать на то, что макрофаги устраняют остатки раковых клеток, образованные цитотоксическими клетками, и это предположительно является прямым следствием ингибирования TGFβ1.

Пример 14: Влияние ингибиторов TGFβ1 на цитотоксические клетки в опухолях MBT2

[987] Гранульный экзоцитоз представляет собой один из механизмов, с помощью которого цитотоксические Т-клетки взаимодействуют и устраняют резидентные опухолевые клетки. После активации гранулы сливаются с цитоплазматической мембраной и высвобождают свое содержимое, включая цитотоксины, такие как перфорин и гранзим B, что приводит к элиминации опухолевых клеток. Кроме того, антиген CD8 (CD8a) представляет собой гликопротеин клеточной поверхности, обнаруженный на большинстве цитотоксических Т-клеток, который действует как корецептор с Т-клеточным рецептором. Соответственно, уровни CD8a, перфорина и гранзима B измеряли в опухолях, обработанных Ab3 или Ab6, каждое из них в комбинации с антителом к PD-1, для оценки активности эффекторных Т-клеток.

Способы

[988] Самкам мышей C3H/HeN в возрасте 8-12 недель имплантировали 5×10^5 опухолевых клеток MBT2 в бок. Перед началом обработки животных рандомизировали на группы введения препаратов со средним размером опухоли 40-80 $мм^3$. Антитело к PD1 (RMP1-14) вводили два раза в неделю в дозе 10 мг/кг. Ab3 вводили один раз в неделю в дозе 30 мг/кг. После 8 дней введения через 8 часов после последнего введения (три полные дозы антитела к PD1, две полные дозы Ab3) животных умерщвляли и вырезали опухоли. Для Ab6 иммунный контекст анализировали на 10-й или 13-й день после обработки. Антитело к PD-1 вводили в дозе 10 мг/кг два раза в неделю. Ab6 вводили еженедельно в дозе 10 мг/кг. Опухоли мгновенно замораживали в жидком азоте, измельчали пакетах Covaris с использованием импактора cryoPREP и экстрагировали РНК с использованием

тризола/хлороформа. кДНК генерировали с использованием Taqman Fast Advanced Master Mix, а CDNA загружали в специальную карту Taqman Array Card с праймерами и зондами, направленными против генов, представляющих интерес. qPCR выполняли на термоциклере Viia7. Экспрессию генов CTL нормализовали по отношению к HPRT для каждого образца и кратность изменения выражали в виде антитела к PD1/Ab3 или антитела к PD1/Ab6 по сравнению с одним антителом к PD1.

Результаты

[989] Комбинация антитела к PD1/Ab3 индуцировала мощную активацию генов CTL, ассоциированных с противоопухолевым ответом, по сравнению с одним антителом к PD1, в опухоли (см. фиг. **25**). В модели опухоли MBT2 одно антитело к PD1 приводило к очень незначительному подавлению роста опухоли и противоопухолевому иммунитету. Таким образом, эти результаты указывают на то, что добавление антител к TGFβ делает возможным полную активацию и инфильтрацию эффекторных CD8 Т-клеток.

Пример 15: Эффект Ab3 и Ab6 на активность Treg in vitro

Способы

[990] PBMC человека выделяли из лейкоцитарной пленки здоровых доноров с помощью фиколла. CD4 клетки отбирали с помощью магнитной селекции, а затем $CD25^{+}CD127^{lo}$ Treg сортировали. Клон BC96 (ThermoFisher) использовали для CD25hi, а клон HIL 7Rm21 (BD Bioscience) использовали для CD127lo с использованием Biorad S3E. Отсортированные Treg стимулировали в течение 1 недели с помощью связанного с планшетом антитела к CD3 (клон OKT3, Biolegend) и растворимого антитела к CD28 (клон 28.2, Biolegend) в среде TexMacs (Miltenyi). В некоторых исследованиях IL2 дополнительно добавляли для усиления экспрессии GARP и про-TGFβ. Treg кокультивировали 1:1 с аутологичными CD4 Т-клетками, окрашенными Cell Trace Violet 9invitrogen) и снова стимулировали антителом к CD3/антителом к CD28 в течение пяти дней. Через 5 дней деление клеток измеряли с помощью проточной цитометрии (проточный цитометр Attune, ThermoFisher Scientific), контролируя разведение фиолетового красителя Cell Trace, и анализировали с помощью FlowJo (BD Bioscience).

Результаты

[991] В течение 5 дней культивирования 80% эффекторных CD4 Т-лимфоцитов (Teff) поделились. Добавление Treg 1:1 подавляло деление Teff почти до 15%, а последующее добавление Ab3 в дозе 10 мкг/мл полностью подавляло Treg-опосредованное ингибирование Т-эффекторного деления (см. фиг. **26A**). 1 мкг/мл Ab3 менее эффективно ингибировало супрессию Treg. Как 1 мкг/мл, так 10 мкг/мл Ab6 в равной степени

ингибировали TGFβ, происходящий из Treg. Таким образом, Ab6, по-видимому, является более сильным ингибитором активации TGFβ1 комплекса GARP-proTGFβ1 в отношении Treg.

Пример 16: Эффекты комбинированного лечения Ab6/антителом к PD-1 на внутриопухолевые популяции иммунных клеток/контекст в опухолях MBT2

[992] Для начала изучения различных популяций иммунных клеток, которые могут опосредовать наблюдаемые эффекты регрессии опухоли у мышей, обработанных комбинацией антитела к PD-1 и Ab6, для исследований FACS использовали модель опухоли MBT2. Дизайн исследования кратко обобщен ниже.

Таблица 23. Схема исследования иммунного контекста опухоли MBT2

Группа	Описание группы	График введения	Сбор образцов и анализ
1	Контрольный IgG к PD1 + контрольный IgG к Ab6 (n = 12)	То же, что и в группах 2 и 3 (см. ниже)	Для каждой группы: i) Целые опухоли от 6 животных для проточной цитометрии (фиг. **27-29**) Для оставшихся 6 животных: ii) ½ опухоли для анализа РНК (фиг. **31 и 32**) iii) ½ каждой опухоли для IHC (фиг. **30A-D и F**)
2	Ab6 (n = 12)	10 мг/кг в 1-й и 8-й дни (10 мг/кг/неделя)	
3	Антитело к PD1 (n = 12)	10 мг/кг в 1-й, 4-й, 8-й и 11-й дни (20 мг/кг/неделя)	
4	Ab6 + антитело к PD1 (n = 12)	То же, что и в группах 2 и 3 (см. выше)	

[993] Каждая группа исследования состояла из 12 мышей с опухолями MBT2, как описано в настоящем документе. Группа обработки Ab6 получала антитело еженедельно, в 1-й день и на 8-й день в дозе 10 мг/кг. Группу обработки антителом к PD1 обрабатывали каждые две недели в дозе 10 мг/кг на инъекцию в 1-й, 4-й, 8-й и 11-й дни, в общей сложности 20 мг/кг в неделю. Каждую контрольную группу IgG обрабатывали соответственно для соответствия подтипу IgG антитела к PD1 и Ab6. На 13-й день у мышей собирали опухоли, как продемонстрировано выше.

[994] *Анализ проточной цитометрией:* Подмножества опухолеассоциированных иммунных клеток также анализировали с помощью проточной цитометрии опухолей MBT-2. Вкратце, опухоли вырезали и взвешивали перед диссоциацией с использованием набора для диссоциации опухолей для gentleMACS (Miltenyi). Образцы фильтровали через фильтр для клеток 70 мкм для удаления любых агрегатов. Lve, синглетные клетки промывали буфером FAC перед нанесением окрашивающего коктейля, содержащего: MuTruStain FCX

(Biolegend), Anti-FcyRIV (Biolegend), Live/Dead (Thermofisher), клон 30-F11 CD45-AF700 (Biolegend), клон 17A2 CD3-PE (Biolegend), клон GK1.5 CD4-BUV395 (BD Biosciences), клон 53-6.7 CD8-APC-H7 (BD Biosciences), клон M1/70 CD11b-PerCP-Cy5.5 (Biolegend), клон RB6-8C5 GR-1-FITC (Biolegend), клон FJK-16s FoxP3-APC (ThermoFisher), клон BM8 F4/80-PE-Dazzle (Biolegend), клон C068C2 CD206-BV421 (Biolegend). Проточную цитометрию выполняли на Attune NxT (ThermoFisher) и анализировали с помощью FlowJo (BD Bioscience).

[995] Стратегия гейтинга для выявления субпопуляций Т-клеток в опухолях MBT2 представлена на фиг. **27A**. Результаты обобщены на фиг. **27B**, измеренные в опухолях, собранных на 13-й день после начала обработки. Как продемонстрировано, Ab6, используемое в сочетании с антителом к PD1, способно преодолевать иммунное исключение, обеспечивая инфильтрацию и экспансию CD8+ Т-клеток в опухолях. В частности, комбинация антитела к PD1/Ab6 индуцировали значительное повышение количества (частоты) внутриопухолевых CD8+ Т-клеток, в то время как никаких изменений в % CD45+ клеток от общего количества живых клеток не наблюдали в группах обработки. Комбинация антитела к PD1/Ab6 вызывала значительное повышение количества Treg; однако соотношение CD8+:Treg существенно не изменялось по сравнению с обработкой антителом к PD1.

[996] Стратегия гейтинга для выявления субпопуляций миелоидных клеток представлена на фиг. **28A**. Результаты обобщены на фиг. **28B**, измеренные в опухолях, собранных на 13-й день после начала обработки. Миелоидный инфильтрат на 13-й день демонстрировал, что количество всех иммунных клеток (например, CD45+) оставалось стабильным во всех группах обработки. Количество всех миелоидных клеток (например, CD11b+, F4/80 $^{lo\text{-}hi}$) было значительно изменено в результате обработки антителом к PD1/Ab6. В частности, в контрольной группе миелоидная фракция составляла почти 75% популяций макрофагов в опухоли. Эта фракцию снижали до менее чем половины в группе комбинированной обработки, что совпало с заметным снижением количества (частот) проопухолевых макрофагов типа M2, а также почти полным устранением фракции MDSC в этой группе, в то время как макрофаги типа M1 оставались относительно неизменными.

[997] Среди миелоидных субпопуляций клеток, MBT-2 опухолеассоциированные макрофаги M2 продемонстрировали высокую экспрессию LRRC33 на клеточной поверхности (фиг. **28C**). Субпопуляции MDSC также демонстрировали значительную экспрессию LRRC33. Большая часть (67,8%) подтипа G-MDSC, выделенного из опухоли MBT-2, экспрессировала LRRC на поверхности клеток, в то время как приблизительно одна

треть подтипа M-MDSC, выделенного из опухоли MBT-2, экспрессировала LRRC33 на поверхности клеток (фиг. **28D**).

[998] Кроме того, в группе обработки антителом к PD1/Ab6 наблюдали значительное увеличение соотношения CD8+ Т-клетки:макрофаги M2 (см. фиг. **29C**). В совокупности данные демонстрируют, что селективные в отношении изоформы ингибиторы TGFβ1 можно использовать для преодоления иммунного исключения опухоли при использовании в сочетании с терапией блокадой контрольных точек. Это может быть, по меньшей мере, частично опосредовано стимулированием инфильтрации и экспансии CD8+ Т-клеток при одновременном снижении проопухолевых макрофагов (M2) и иммуносупрессорных MDSC в окружении опухоли. Возможно, что эти эффекты могут быть опосредованы фрагментом GARP и фрагментом LRRC33 TGFβ1 соответственно.

[999] Для иммуногистохимического анализа опухоли шести животных разрезали пополам и фиксировали. Срезы готовили для IHC и окрашивали различными маркерами иммунных клеток. На фиг. **30** представлены иллюстративные изображения на 10-й или 13-й день. Как продемонстрировано, заметное повышение частоты CD8+ Т-клеток в опухоли наблюдали в группе, обработанной комбинацией антитела к PD1/Ab6 (фиг. **30D**). Данные указывают на то, что Ab6 можно применять в сочетании с терапией блокадой контрольных точек для преодоления иммунного исключения путем индукции инфильтрации и экспансии цитотоксических Т-клеток. На фиг. **30E** представлена количественная оценка данных IHC, представленных в виде % CD8-положительных клеток от общего числа ядер. В этой модели опухоли присутствовало несколько исходных CD8+ клеток (например, «холодная» опухоль). В группах, обработанных либо одним Ab6, либо одним антителом к PD-1, наблюдали незначительное повышение процента CD8+ (в каждой ~ 10%). В отличие от этого, в группе, обработанной комбинацией, достигали заметного повышения частоты CD8+ клеток в опухоли, что указывало на то, что ингибирование TGFβ1 в комбинации с ингибированием контрольных точек может синергетически вызывать противоопухолевые эффекты за счет преодоления иммунного исключения. Данные предполагают, что комбинация может эффективно преобразовывать «иммунно-исключенную» опухоль в «воспаленную/горячую» опухоль.

[1000] Для подтверждения изменений экспрессии генов, которые коррелируют с наблюдаемым иммунным ответом в опухолях MBT2, проводили анализ экспрессии РНК. Препараты РНК из опухолей MBT2 13-го дня анализировали в отношении экспрессии генов на основе qPCR. Для исследования использовали РНК, приготовленную из 5-6 животных на группу. Анализы включали уровни экспрессии следующих генов, используемых в качестве указанного маркера: Ptprc (CD45); Cd8a (CD8 Т-клетка); Cd8b1 (CD8 Т-клетка);

Cd4 (CD4 Т-клетка); Cd3e (Т-клетка); Foxp3 (Treg); Ifng (Th1-иммунитет); Prf1 (белок CTL); Gzmb (белок CTL); Gzma (белок CTL); Klrk1 (NK/CTL); Adgre1 (макрофаг F4/80); Mrc1 (макрофаг M2); Cd163 (макрофаг M2); Cd80 (костимулирующая APC/макрофаг M1); Ptger2 (опухолевый ангиогенез); Nrros (LRRC33); Tgfb1 (иммунная устойчивость);18S (домашнее хозяйство); и Ppib (домашнее хозяйство).

[1001] **На фиг. 31A-31D** представлены изменения экспрессии генов иммунного ответа Ptprc, CD8a, CD4 и Foxp3 соответственно. Обработка комбинацией антитело PD1/Ab6 индуцировала значительное повышение уровня этих транскриптов в опухолях MBT2. Эти наблюдения подтверждают, что обработка антителом к PD1/Ab6 вызывает массивную миграцию CD8+ Т-клеток, вооруженных цитотоксическими эффекторными белками, такими как перфорин и гранзим.

[1002] **На фиг. 32** представлены изменения экспрессии генов иммунных маркеров Ifng, Gzmb, Prf1 и Klrk1 на 10-й или 13-й день. Как изображено, pPCR-анализ этих маркерных генов демонстрирует, что комбинированная обработка антителом к PD-1 и ингибитором TGFβ1 индуцировала экспрессию генов маркеров цитолитических белков (гранзима B и перфорина), Th1-иммунитета (IFNγ) и маркера клеток CTL/NK (Klrk1) в опухоли. Эти данные представляют дополнительные доказательства, подтверждающие синергетические эффекты ингибирования контрольных точек и ингибирования TGFβ1, которые опосредуют противоопухолевые эффекты.

[1003] В целом, эти результаты в совокупности демонстрируют устойчивую мобилизацию противоопухолевого иммунитета, вызванную блокадой контрольных точек и ингибированием TGFβ1. В частности, хотя общая фракция инфильтрирующих опухоль иммунных клеток оставалась постоянной для всех групп обработки, комбинация антитела к PD-1/Ab6 вызывала a) значительное повышение количества внутриопухолевых CD8+ Т-клеток (* $P < 0,05$, двусторонний Т-критерий по группой антитела к PD-1); b) значительное повышение количества Treg (* $P < 0,05$), однако соотношение CD8+:Treg не изменилось (н.з., не значимо по сравнению с антителом к PD-1); и, c) значительное снижение количества миелоидных клеток по сравнению с любой другой группой, обусловленное снижением популяций иммуносупрессорных макрофагов M2 и миелоидных супрессорных клеток (MDSC) (* $P < 0,05$, двусторонний Т-критерий по сравнению с группой антитела к PD-1). Количественный PCR-анализ целых опухолевых лизатов подтверждал устойчивое повышение экспрессии генов CD8 эффекторов. Аналогичным образом, комбинация антитела к PD-1 и Ab6 индуцировала заметное повышение частоты CD8+ Т-клеток в опухолевой массе, преодолевая иммунное исключение.

[1004] Для подтверждения эффектов на последующую передачу сигналов с участием TGFβ1, проводили дополнительные иммуногистохимические анализы для обнаружения и локализации фосфорилированного SMAD3 в опухолях MBT2. Как изображено на фиг. **30F**, обнаружили, что фосфо-SMAD3 обогащен вблизи эндотелия сосудов в опухолях, обработанных антителом к PD-1. Обработка Ab6 устраняла этот сигнал, подтверждая представление о том, что ингибирование TGFβ1 может способствовать внутриопухолевой инфильтрации иммунных клеток, тем самым превращая иммунно-исключенную опухоль в воспаленную опухоль, которая отвечает на блокаду контрольных точек.

[1005] Животные, обработанные антителом к PD-1, демонстрировали некоторое количество инфильтрирующих CD8+ Т-клеток, тесно ассоциированных с сосудистой сетью опухоли (окрашивание CD31; эндотелиальный маркер). Комбинированная обработка поддерживала дальнейшую инфильтрацию Т-клеток. Близость CD8+ Т-клеток к эндотелию сосудов предполагает, что Т-клетки могут проникать в опухоль из внутриопухолевой сосудистой сети. Взаимосвязь между CD8-положительными областями опухоли и расстоянием от CD31-положительной сосудистой сети изображена на фиг. **30G**. Гистограмма демонстрирует, что комбинированная обработка (ингибирование TGFβ1 и блокада контрольных точек) повышает долю области CD8+, особенно в областях, удаленных от кровеносных сосудов, предполагая, что ингибирование TGFβ1 способствует инфильтрации клеток CD8+ в опухоль через сосудистую сеть, эффективно преодолевая или обращая иммуносупрессию.

Пример 17: Влияние селективных в отношении изоформы контекстно-независимых ингибиторов TGFβ1 на модель MPL миелопролиферативного нарушения

[1006] Доклиническую модель миелофиброза MPLW515L описывали ранее (см., например, Wen et al., Nature Medicine volume 21, pages 1473–1480 (2015)). Вкратце, мышей-реципиентов облучают летальной дозой и впоследствии им трансплантируют донорские клетки костного мозга, трансдуцированные человеческим рецептором тромбопоэтина MPL, имеющим конститутивную активирующую мутацию в W515L (MPLW515L). У мышей-реципиентов в этой модели разовьется лейкоцитоз, полицитемия и тромбоцитоз через 2-3 недели.

[1007] Для оценки эффектов TGFβ1-селективного ингибирования в мышиной модели миелофиброза, в модели MPL^{W515L} исследовали высокоаффинный специфический в отношении изоформы контекстно-независимый ингибитор TGFβ1 (Ab6). Вкратце, полмиллиона MPL+ ckit+ клеток трансплантировали самкам мышей BALB/c в возрасте 8-10 недель. Через 3 недели мыши-реципиенты получали еженедельно i.p. инъекции Ab6 в

дозе 10 или 30 мг/кг/неделя или отрицательный контроль IgG (30 мг/кг/неделя) в течение 4 недель (в общей сложности 5 доз). Через 24 часа после последней дозы мышей умерщвляли.

[1008] Гистопатологический анализ костного мозга выполняли для оценки антифибротического эффекта Ab6, как определено по окрашиванию ретикулином. Предварительные данные указывают на то, что срезы костного мозга, взятые у животных, обработанных Ab6, продемонстрировали антифибротический эффект. Изображения, полученные при окрашивании ретикулином иллюстративных срезов костного мозга, представлены на фиг. **36A**. Видимое сокращение волокон ретикулина (в основном коллагена III типа) наблюдали у мышей, которые получали Ab6 в дозах 10 и 30 мг/кг еженедельно. Аналогичные, но в меньшей степени антифиброзные эффекты наблюдали также при исследовании второго TGFβ1-селективного антитела (данные не продемонстрированы).

[1009] Для количественного анализа, основанного на оценке фиброза срезов костного мозга, проведенной патологом, окрашивание ретикулином оценивали с использованием системы классификации, опубликованной ВОЗ (Thiele J, Kvasnicka HM, Tefferi A et al. Primary myelofibrosis In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al (eds). WHO Classifications of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 4th edn. IARC Press: Lyon, France, 2008, pp 44–47). Вкратце, гистологические срезы оценивали с использованием четырехуровневой системы (MF-0, MF-1, MF-2 и MF-3). Оценка MF-0 указывала на рассеянный линейный ретикулин без пересечений (кроссоверов), соответствующий нормальному костному мозгу. Оценка MF-1 указывала на рыхлую сеть ретикулина с множеством пересечений, особенно в периваскулярных областях. Оценка MF-2 указывала на повышение диффузной и плотной сети ретикулина с обширными пересечениями, иногда с фокальными пучками коллагена и/или фокальным остеосклерозом. Оценка MF-3 указывала на диффузную и плотную сеть ретикулина с обширными пересечениями и грубыми связями коллагена, часто ассоциированную с остеосклерозом.

[1010] Оценки фиброза представлены на фиг. **36B**, что указывает на дозозависимый антифибротический эффект Ab6 по сравнению с животными, которые получали контрольный IgG. На левом графике изображены оценки фиброза из первого исследования (исследование 1), в котором животных с высоким бременем болезни (> 50%) в начале лечения обрабатывали Ab6 или контрольным IgG, как продемонстрировано. Исследование повторяли (исследование 2). Данные из соответствующих когорт комбинировали и представляли на правом графике (исследования 1 + 2). Еженедельное введение 30 мг/кг Ab6 значительно уменьшало фиброз.

[1011] Животных также оценивали по различным гематологическим параметрам, например, по полному анализу крови (CBC) после трансплантации костного мозга (включая лейкоциты (WBC), тромбоциты (Plt), гемоглобин (HB) и гематокрит (HCT)) с использованием стандартных методик (фиг. **36C** и **36D**). Не удивительно, что после 4 недель начала обработки у мышей MPL, обработанных контрольным IgG, по-видимому, проявлялись гематологические аномалии, характерные для миелофиброза, включая повышенные уровни WBC и Plt. Животные, обработанные Ab6, демонстрировали дозозависимую тенденцию к нормализации концентраций WBC, Plt и HB, а также изменения относительно исходного уровня по сравнению с животными, обработанными контрольным IgG. Кроме того, животные, обработанные Ab6, продемонстрировали статистически значимую нормализацию концентраций HCT, а также изменение относительно исходного уровня по сравнению с животными, обработанными контрольным IgG, у которых уровни Hct, по-видимому, восстановились до исходного уровня через 4 недели.

Пример 18: Эффекты высокоаффинного ингибитора TGFβ1 на модель сингенной карциномы молочной железы EMT-6

[1012] Рак молочной железы представляет собой наиболее распространенный вид рака среди женщин в Соединенных Штатах Америки и является четвертой по значимости причиной смерти от рака. Как изображено на фиг. **20D** (слева) и фиг. **35**, опухоли EMT6 экспрессировали значительные уровни как TGFβ1, так и TGFβ3 (например, кодоминантных TGFβ1 и TGFβ3), в отличие от многих опухолей, которые преимущественно экспрессируют TGFβ1. Вклад TGFβ3 в этих опухолях в иммунное исключение и устойчивость к CBT неясен.

[1013] Ранее было продемонстрировано, что Ab3 (селективный в отношении изоформы контекстно-зависимый ингибитор TGFβ1) проявляет частичное влияние на рост и выживаемость опухоли в этой модели, как описано в WO 2018/129329.

[1014] В этих исследованиях эффекты комбинации селективного в отношении изоформы ингибитора TGFβ1 и селективного в отношении изоформы ингибитора TGFβ3 оценивали на модели EMT6 в сочетании с ингибитором иммунных контрольных точек. Было высказано предположение, что, поскольку эта опухоль является кодоминантной в отношении изоформы TGFβ1 и TGFβ3, такая комбинированная терапия может демонстрировать эффективность в регрессии опухоли, в то время как предполагалось, что любой из селективных в отношении изоформы ингибиторов в отдельности (TGFβ1 или

TGFβ3) в сочетании с ингибитором контрольной точки должен оказывать частичное действие на подавление роста опухоли.

[1015] Опухоли EMT6 имплантировали подкожно. Обработку начинали, когда опухоль EMT6 достигла 30-80 мм^3. Антитело к PD-1 вводили в дозе 10 мг/кг два раза в неделю. Ab6 вводили однократно еженедельно в дозе 10 мг/кг. Нейтрализующее антитело к TGFβ3 вводили в дозе 30 мг/кг один раз в неделю.

[1016] Ответившими на терапию считались те, кто достиг размера опухоли < 25% от объема конечной точки в конце исследования.

[1017] Неожиданным образом оказалось, что Ab6, высокоаффинный селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1, применяемый в комбинации с антителом к PD-1, оказалось достаточным для преодоления устойчивости к ингибированию контрольных точек в EMT6. На фиг. **34A** изображены эффекты Ab6 и/или антитела к PD-1 на рост опухоли. Ни одно из антител не приводило к значительной регрессии опухоли при использовании в отдельности. В комбинации, однако, 50% обработанных животных (5 из 10) достигали значительной регрессии опухоли (уменьшение конечного объема опухоли до 25% или менее). Эти данные демонстрируют синергетическую противоопухолевую эффективность, о чем свидетельствуют либо полные ответы, либо задержка роста опухоли в группах комбинированной терапии. Неожиданным образом добавление селективного в отношении изоформы ингибитора TGFβ3 не дало дополнительных эффектов. Наблюдение за тем, что ингибирование изоформы TGFβ1 с помощью Ab6 было достаточным для сенсибилизации опухолей к антителу кPD-1, даже в присутствии внутриопухолевого TGFβ3, подтверждает гипотезу о том, что TGFβ1 представляет собой изоформу, которая контролирует ассоциированную с заболеванием передачу сигналов с участием TGFβ, иммунное исключение и первичную устойчивость к СВТ.

[1018] Соответственно, комбинированная терапия (TGFβ1 + антитело к PD-1) обеспечивала значительное преимущество в отношении выживаемости у обработанных животных по сравнению с одним антителом к PD-1 (***, P <0,001, логранговый критерий) (см. фиг. **34B**). Через 56 дней после начала обработки 60% животных были живы в группе комбинации, тогда как в других группах обработки все животные погибли или нуждались в эвтаназии к 28-му дню.

[1019] Отдельное исследование (исследование 2) также продемонстрировало значительное повышение выживаемости у животных с TGFβ1/3-положительными опухолями EMT6, обработанными комбинацией Ab6 и антитела к PD-1, но не у животных, обработанных одним антителом (фиг. **34C**). В этой модели прекращали обработку, и за выжившими без опухоли EMT-6 наблюдали в течение 6 недель без введения препаратов

(прямоугольник серого цвета). Через шесть недель после прекращения введения у пациентов с полным ответом на терапию опухоли по-прежнему не наблюдали, что снова демонстрирует устойчивость ответа (фиг. **34C**, справа). Сообщенное количество представляло собой количество животных с отсутствием подлежащих измерению опухолей в конце исследования. Наблюдали значительные преимущества в отношении выживаемости комбинированной обработки (Ab6 + антитело к PD-1) по сравнению с животными, обработанными только антителом к PD-1 (фиг. **34D**).

Пример 19: Экспрессия рекомбинантного белка

[1020] Рекомбинантные белки экспрессировали в клетках Expi293F ™ (Thermo Fisher), временно трансфицированных плазмидами pTT5 (NRC Canada), содержащими кДНК, представляющую интерес. Большие латентные комплексы TGFβ получали путем котрансфекции клеток Expi293F™ плазмидой, кодирующей proTGFβ1, proTGFβ2 или proTGFβ3, и плазмидой, кодирующей LLC-презентирующий белок. Фрагменты LTBP, которые содержат TGFβ-связывающий домен TB3 и фланкирующие EGF-подобные домены, использовали для повышения выхода и качества белка по сравнению с полноразмерными LTBP (от E873 до I1507 для LTBP1 человека; от D866 до E1039 для LTBP3 человека). Фрагменты LTBP имели C-концевую His-метку для облегчения очистки. Получали стабильные клеточные линии Expi293, которые экспрессировали на C-конце His-меченные эктодомены GARP или LRRC33. Эти стабильные клетки временно трансфицировали плазмидой, кодирующей proTGFβ1, для образования комплексов GARP или LRRC33 с латентным TGFβ1. Малые латентные комплексы TGFβ экспрессировали с помощью N-концевой His-метки и цистеина, образующего большой латентный комплекс, мутировавшего в серин (C4S в TGFβ1, C5S в TGFβ2 и C7S в продоменах TGFβ3). Факторы роста активного TGFβ приобретали в R&D Systems. Трансфектанты культивировали в среде для экспрессии Expi293™ (Thermo Fisher) в течение 5 дней до сбора кондиционированного супернатанта. Рекомбинантные белки очищали с помощью Ni2+ аффинной хроматографии с последующей эксклюзионной хроматографией (SEC). Качество белка и образование дисульфидно-связанных комплексов подтверждали с помощью SDS PAGE и аналитической SEC. Антитела экспрессировали путем котрансфекции клеток Expi293F™ плазмидами pTT5, кодирующими тяжелые и легкие цепи, представляющие интерес. Антитела IgG4 человека и IgG1 мыши очищали с помощью захвата белка A с последующей SEC. Идентичность антител, которые применяли в животных моделях, подтверждали масс-спектрометрией.

Пример 20: Сингенные мышиный модели

[1021] По данным IACUC, мышиные модели выполняли в лаборатории Charles River Discovery Labs в Моррисвилле, Северная Каролина. Для модели MBT-2 самок мышей C3H/HeN (Charles River) в возрасте 8-12 недель анестезировали изофлураном для подкожной имплантации 5×10^5 опухолевых клеток MBT-2 в бок. Животных распределяли на группы со средним объемом опухоли 40-80 $мм^3$, так что все группы имели одинаковые средние значения и диапазоны начального объема. Для модели CloudmanS91 самок мышей DBA/2 (Charles River) в возрасте 8-12 недель анестезировали изофлураном для имплантации 5×10^5 опухолевых клеток CloudmanS91 в 50% матригеле подкожно в бок. Животных распределяли по группам, когда средний объем опухоли достигал 125-175 $мм^3$, так что все группы имели одинаковое среднее значение объема и диапазон начального объема. Для модели EMT-6 самкам мышей BALB/c в возрасте 8-12 недель (Charles River) имплантировали 5×10^6 опухолевых клеток EMT-6 подкожно в бок. Животных распределяли по группам со средним начальным объемом 30-60 $мм^3$, так что все группы имели одинаковое среднее значение и диапазон начального объема. Контрольный HuNeg-rIgG1 или антитело к PD-1 (RMP1-14; BioXCell) вводили в дозе 10 мг/кг два раза в неделю. Ab6-mIgG1 или контрольное антитело HuNeg-mIgG1 вводили в указанной дозе один раз в неделю. Все антитела вводили внутрибрюшинно. Объем опухоли измеряли два раза в неделю, и животных умерщвляли с помощью асфиксии CO_2, когда опухоль достигала 1200 $мм^3$ (MBT-2, EMT6) или 2000 $мм^3$ (CloudmanS91) или после изъязвления. Объем опухоли рассчитывали в виде $мм^3 = (w^2 \times l)/2$. Ответившие на терапию или скорость ответа определяли в виде объема опухоли, равного или ниже 25% объема конечной точки для этой модели. Полный ответ классифицировали в виде опухоли менее 13,5 $мм^3$ при трех или более последовательных измерениях. У выживших без опухоли отсутствовала пальпируемая опухоль в конце исследования. Животных, умерщвленных вследствие некроза согласно IACUC, полностью исключали из анализа.

[1022] Относительные экспрессии трех изоформ TGFβ и презентирующих молекул принимали во внимание для выбора доклинических фармакологических моделей, которые воспроизводят клинические данные человека. ELISA-анализы относительной экспрессии белков трех изоформ в MBT-2, S91 и EMT6 представлены на фиг. 20G. Как в опухолях MBT-2, так и в S91, TGFβ1 представлял собой доминантную изоформу, отражающую большинство различных видов рака человека. EMT-6 по-прежнему демонстрировала преобладающую экспрессию TGFβ1, но также коэкспрессию, хотя и в меньшей степени, TGFβ3, что более похоже на то, что наблюдается в определенных карциномах человека.

[1023] Все четыре презентирующие молекулы (LTBP1, LTBP3, GARP и LRRC33) экспрессировали с помощью РНК в опухолях MBT-2, S91 и EMT-6 (фиг. **20H**).

Пример 21: Индуцированная антителами интернализация LRRC33-proTGFβ1

[1024] Наблюдали, что среди типов клеток, которые экспрессируют РНК LRRC33, только подмножество, по-видимому, экспрессирует белок LRRC33 на поверхности клетки. Предположили, что LRRC33 можно регулировать с помощью переноса белков на цитоплазматическую мембрану. Для оценки этой возможности, разрабатывали анализа интернализации.

[1025] Создавали клеточную линию Expi293, которая экспрессирует LRRC33-proTGFβ1 на клеточной поверхности. Используя систему Incucyte, измеряли интернализацию LRRC33 после связывания Ab6 с LRRC33-proTGFβ1 на поверхности клетки. Вкратце, система Incycyte использует pH-чувствительную метку обнаружения, которую можно обнаружить, когда мишень интернализуется во внутриклеточный компартмент с кислым pH (например, лизосому). Наблюдали быструю интернализацию LRRC33-proTGFβ1 при связывании Ab6 в клетках, экспрессирующих LRRC33 и proTGFβ1 (фиг. **6**), но не родительской линии Expi293 (данные не продемонстрированы). Интернализация, наблюдаемая в настоящем документе, была аналогичной интернализации на первичных макрофагах человека.

[1026] Интернализация LRRC33-proTGFβ1 не являлась FcR-опосредованной, поскольку клетки Expi293 не имели Fc-рецепторов (данные не продемонстрированы). Эти результаты указывают на то, что вовлечение Ab6 может способствовать снижению экспрессии мишени. Это может обеспечить дополнительный или альтернативный механизм ингибирования TGFβ1 in vivo за счет снижения доступных уровней proTGFβ1 в очаге заболевания, таком как TME и FME.

[1027] Различные признаки и варианты осуществления настоящего изобретения, упомянутые в отдельных разделах выше, применимы, при необходимости, к другим разделам, с соответствующими изменениями. Следовательно, характеристики, указанные в одном разделе, могут при необходимости быть объединены с характеристиками, указанными в других разделах.

[1028] Специалистам в настоящей области техники будут понятны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанного в настоящем документе, или с помощью проведения обычных экспериментов они будут

способны установить такие эквиваленты. Предполагается, что такие эквиваленты охвачены следующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают каждый из следующих антигенных комплексов с KD, составляющей ≤ 10 нМ, как измерено с помощью анализа на основе титрования равновесного раствора:

i) LTBP1-proTGFβ1 человека;

ii) LTBP3-proTGFβ1 человека;

iii) GARP-proTGFβ1 человека; и

iv) LRRC33-proTGFβ1 человека;

причем антитело или его фрагмент представляет собой полностью человеческое или гуманизированное антитело или его фрагмент, причем необязательно антитело или фрагмент связывает с KD ≤ 1 нМ.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, которые связывают лассо латентности комплексов, причем необязательно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно связывает часть домена фактора роста.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, которые относятся к подтипу IgG4 или IgG1 человека.

4. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов и вспомогательное вещество.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пп. 1-3, или композиция по п. 4 для применения при лечении связанного с TGFβ1 показания у субъекта.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или композиция для применения по п. 5, причем связанное с TGFβ1 показание представляет собой рак.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или композиция для применения по п. 5, причем связанное с TGFβ1 показание представляет собой миелофиброз.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или композиция для применения по п. 6, причем субъект плохо отвечает на терапию рака, причем терапия рака

необязательно представляет собой терапию ингибированием контрольных точек, химиотерапию и/или лучевую терапию.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или композиция для применения по п. 8, причем лечение предусматривает введение композиции по п. 4, в сочетании с дополнительной терапией рака, выбранной из группы, состоящей из ингибитора контрольной точки, химиотерапии и лучевой терапии и/или противораковой вакцины.

10. Способ скрининга селективного в отношении изоформы ингибитора TGFβ1, подходящего для терапевтического применения, причем способ предусматривает следующее:

i) получение антитела, которое специфически связывает каждый из следующего: комплексы LTBP1-proTGFβ1 человека, LTBP3-proTGFβ1 человека, GARP-proTGFβ1 человека и LRRC33-proTGFβ1 человека, с KD $\leq$ 1 нМ,

ii) проведение исследования эффективности in vivo для определения количества антитела, эффективного для достижения эффективности в доклинической модели, содержащей экспрессию со смещением в сторону TGFβ1;

iii) проведение токсикологического исследования на доклинической модели, которая, как известно, чувствительна к ингибированию TGFβ, для определения максимально переносимого и/или минимального токсического количества антитела; и

iv) на основании стадий (ii) и (iii) выбор антитела в качестве терапевтического кандидата, если получено достаточное терапевтическое окно.

11. Способ по п. 10, при котором количество, эффективное для достижения эффективности согласно стадии (ii), составляет приблизительно от 1 до 30 мг/кг.

12. Способ по п. 10, при котором максимально переносимое количество или минимальное токсическое количество согласно стадии (iii) составляет по меньшей мере 100 мг/кг.

13. Способ по любому из пп. 10-12, при котором терапевтическое окно является по меньшей мере шестикратным.

14. Способ производства фармацевтической композиции, предусматривающий:

i) получение антитела, выбранного с помощью способа по любому из пп. 10-13;

ii) составление антитела в виде фармацевтической композиции, содержащей селективный в отношении изоформы ингибитор TGFβ1.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают каждый из следующих антигенных комплексов с KD, составляющей ≤ 5 нМ, как измерено с помощью биослойной интерферометрии:

i) LTBP1-proTGFβ1 человека;

ii) LTBP3-proTGFβ1 человека;

iii) GARP-proTGFβ1 человека; и

iv) LRRC33-proTGFβ1 человека;

причем антитело или его фрагмент ингибирует активацию TGFβ1;

причем антитело или его фрагмент представляет собой полностью человеческое или гуманизированное антитело или его фрагмент;

причем антитело или его фрагмент содержит:

H-CDR1, представленную формулой FTF(X_1)(X_2)(X_3)(X_4)M(X_5), где: X_1 представляет собой S, G или A; X_2 представляет собой S или F; X_3 представляет собой F или Y; X_4 представляет собой S или A; и X_5 представляет собой D, N или Y (SEQ ID NO: 143);

H-CDR2, представленную формулой YI(X_1)(X_2)(X_3)A(X_4)TIYYA(X_5)SVKG, где: X_1 представляет собой S или H; X_2 представляет собой P или S; X_3 представляет собой S или D; X_4 представляет собой D или S; и X_5 представляет собой D или G (SEQ ID NO: 144);

H-CDR3, представленную формулой (X_1)R(X_2)(X_3)(X_4)D(X_5)GDML(X_6)P, где: X_1 представляет собой A или V; X_2 представляет собой G или A; X_3 представляет собой V или T; X_4 представляет собой L или W; X_5 представляет собой Y или M; и X_6 представляет собой M или D (SEQ ID NO: 145);

L-CDR1, представленную в SEQ ID NO: 105;

L-CDR2, представленную в SEQ ID NO: 106; и

L-CDR3, представленную в SEQ ID NO: 12.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают каждый из следующих антигенных комплексов с KD, составляющей ≤ 0,5 нМ, как измерено с помощью биослойной интерферометрии:

i) LTBP1-proTGFβ1 человека;

ii) LTBP3-proTGFβ1 человека;

iii) GARP-proTGFβ1 человека; и,

iv) LRRC33-proTGFβ1 человека;

причем антитело или его фрагмент ингибирует активацию TGFβ1;

причем антитело или его фрагмент представляет собой полностью человеческое или гуманизированное антитело или его фрагмент;

причем антитело или его фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 13, и вариабельный домен легкой цепи (VL), характеризующийся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 15.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, в котором H-CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 107; H-CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 103; и H-CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 6.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 3, которые связывают каждый из следующих антигенных комплексов с KD, составляющей ≤ 1 нМ, необязательно ≤ 0,5 нМ, как измерено с помощью биослойной интерферометрии.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которые связывают эпитоп, который включает в себя один или несколько аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 169.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно связывает часть домена фактора роста.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, содержащие VH согласно SEQ ID NO: 13 и VL согласно SEQ ID NO: 15.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которые относятся к подтипу IgG4 или IgG1 человека.

9. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов и вспомогательное вещество.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пп. 1-8, или композиция по п. 9, для применения при лечении пролиферативного и/или фиброзного нарушения у субъекта.

11 Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или композиция для применения по п. 10, причем нарушение представляет собой рак.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или композиция для применения по п. 10, причем нарушение представляет собой миелофиброз.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или композиция для применения по п. 11, причем субъект характеризуется первичной или приобретенной устойчивостью к терапии рака, причем необязательно терапия рака представляет собой терапию ингибированием контрольных точек, химиотерапию и/или лучевую терапию.

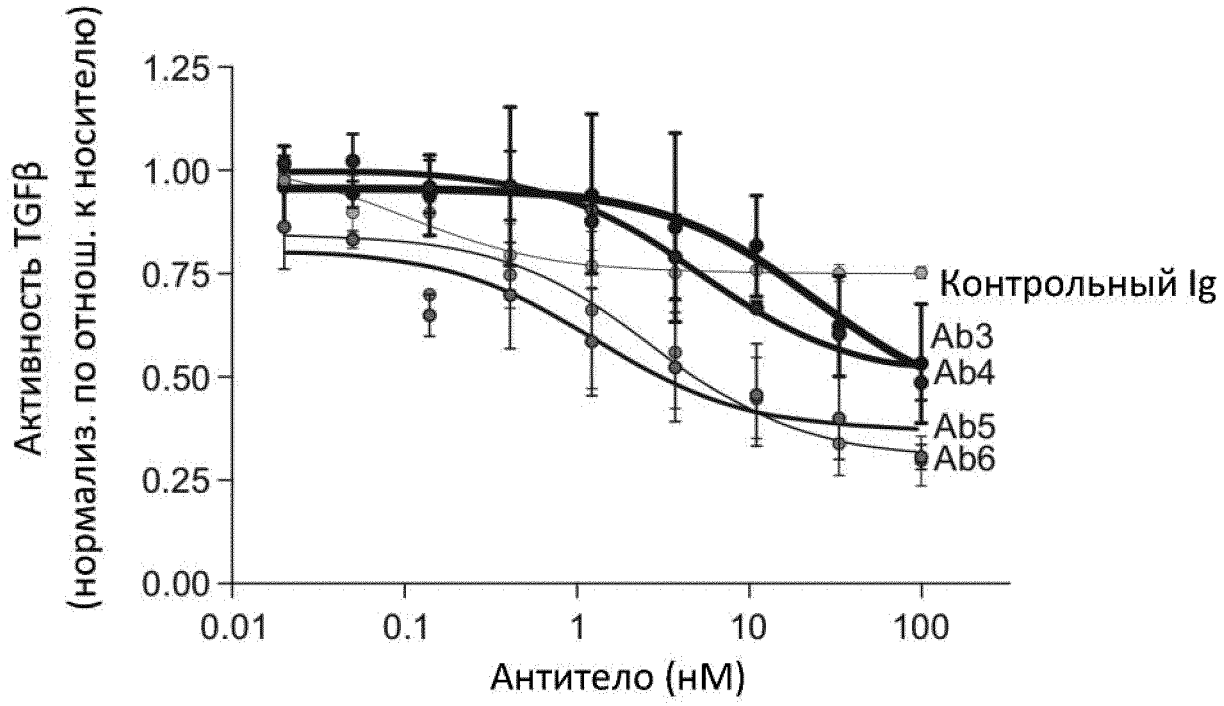
14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или композиция для применения по п. 13, причем лечение предусматривает введение композиции по п. 9, в сочетании с дополнительной терапией рака, выбранной из группы, состоящей из ингибитора контрольной точки, химиотерапии и лучевой терапии и/или противораковой вакцины.

15. Способ производства фармацевтической композиции, предусматривающий:

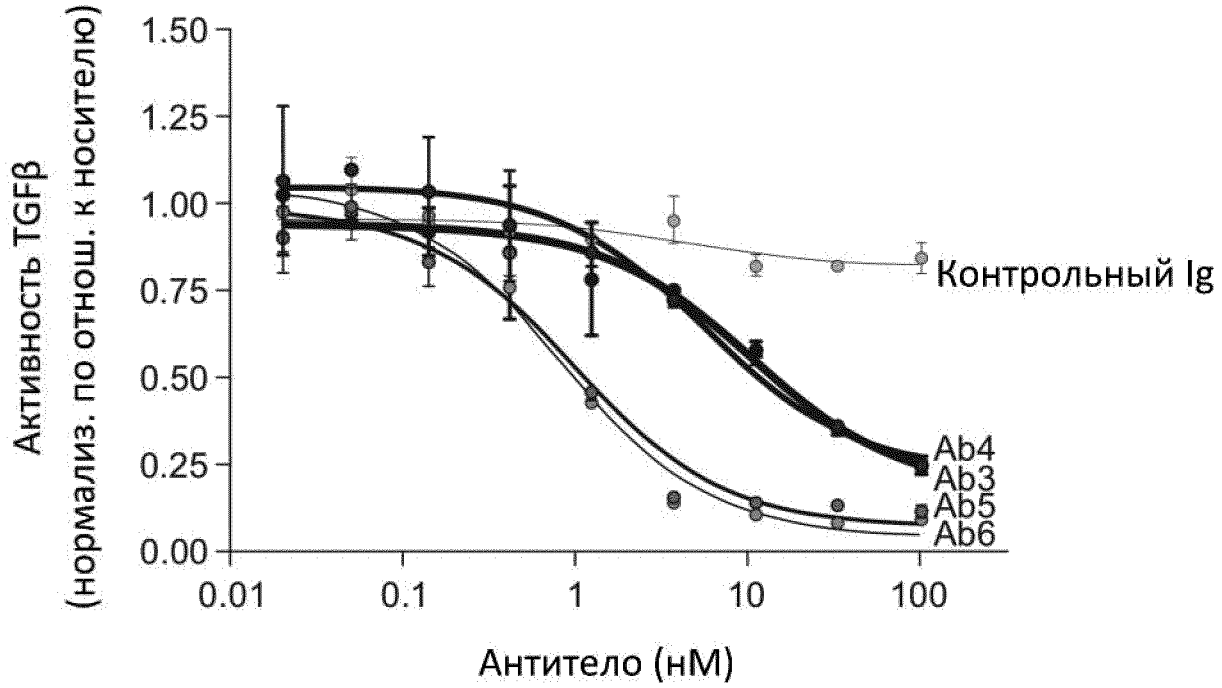
i) получение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-8;

ii) составление антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в виде фармацевтической композиции с фармацевтически приемлемым носителем.

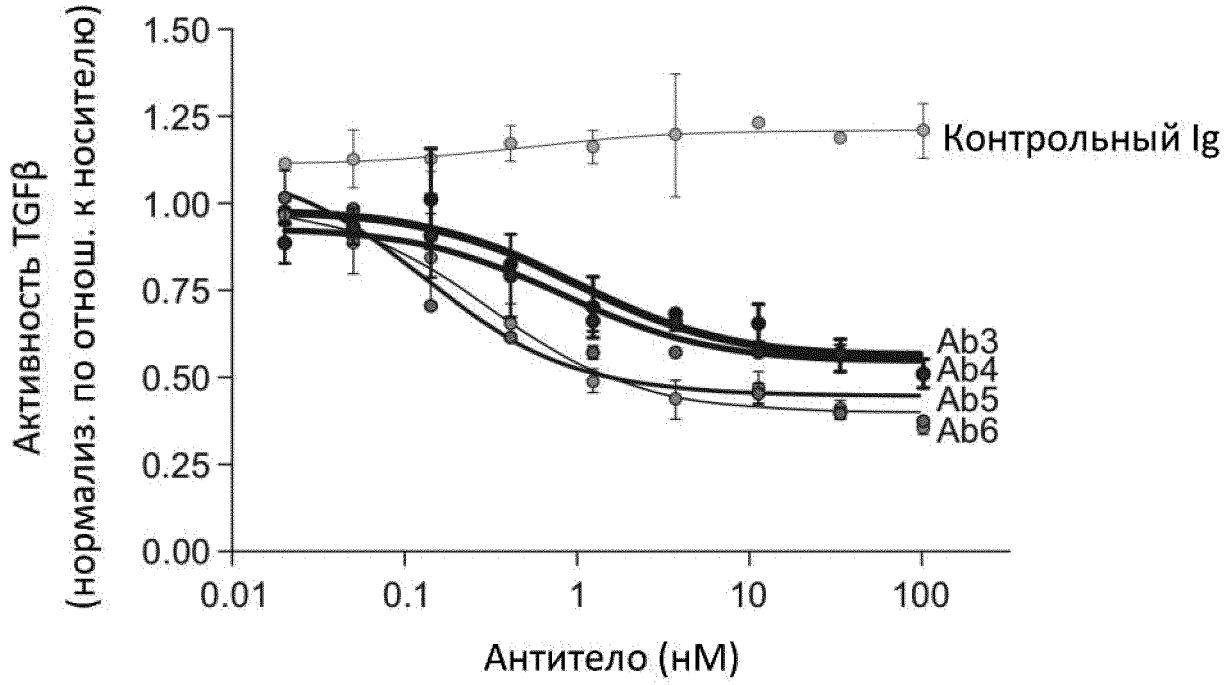
Фиг. 1


Активность TGFβ
(нормализ. по отнош. к носителю)
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0.01
0.1
1
10
100
Антитело (нМ)
Контрольный Ig
Ab3
Ab4
Ab5
Ab6

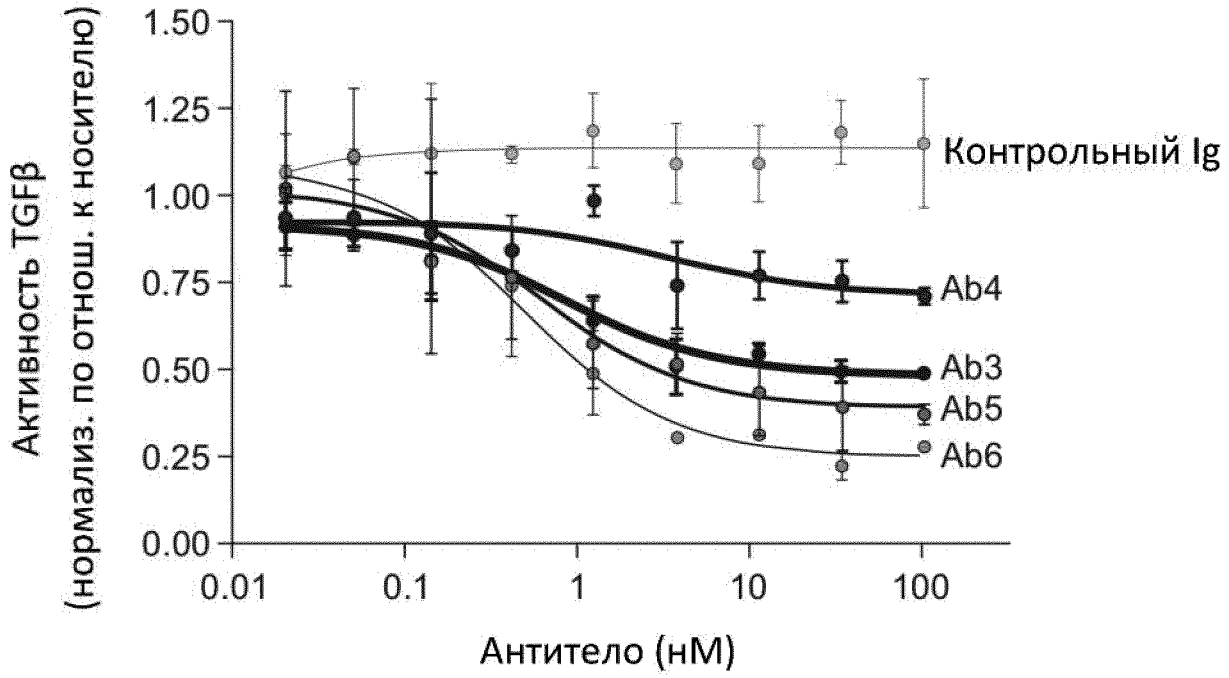
Фиг. 2


Активность TGFβ
(нормализ. по отнош. к носителю)
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0.01
0.1
1
10
100
Антитело (нМ)
Контрольный Ig
Ab4
Ab3
Ab5
Ab6

Фиг. 3

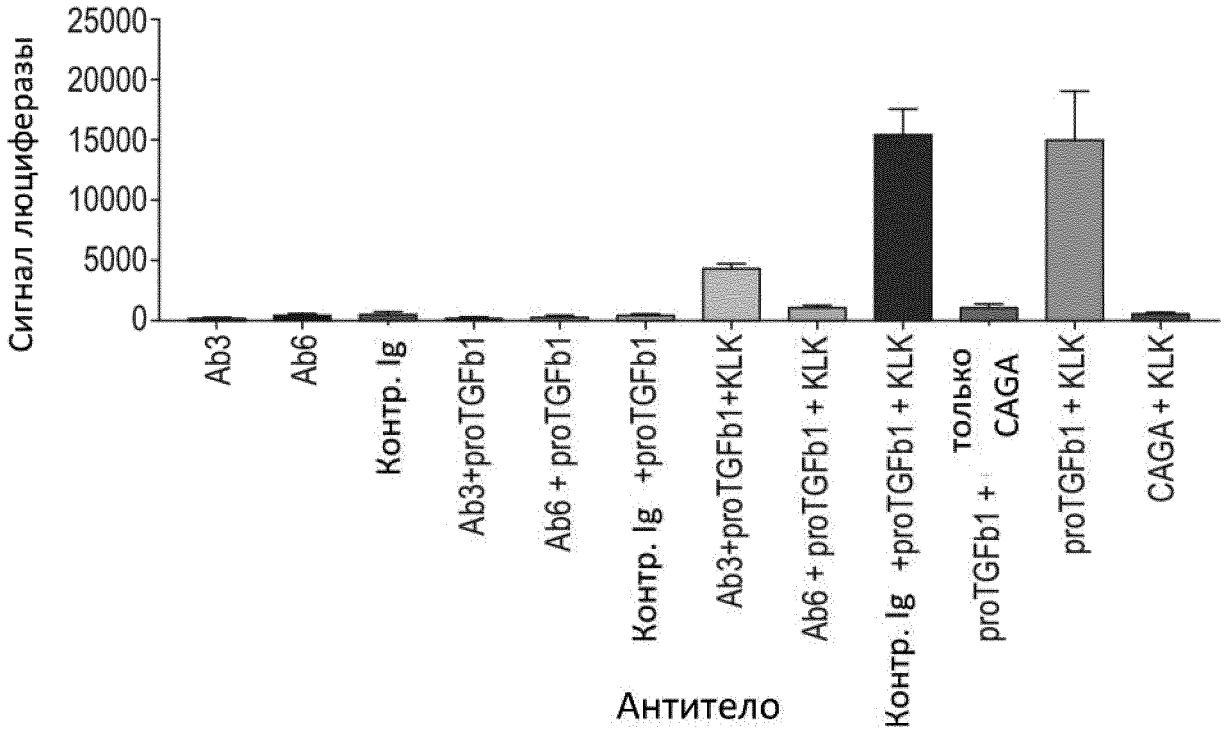

Активность TGFβ
(нормализ. по отнош. к носителю)
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0.01
0.1
1
10
100
Антитело (нМ)
Контрольный Ig
Ab3
Ab4
Ab5
Ab6

Фиг. 4

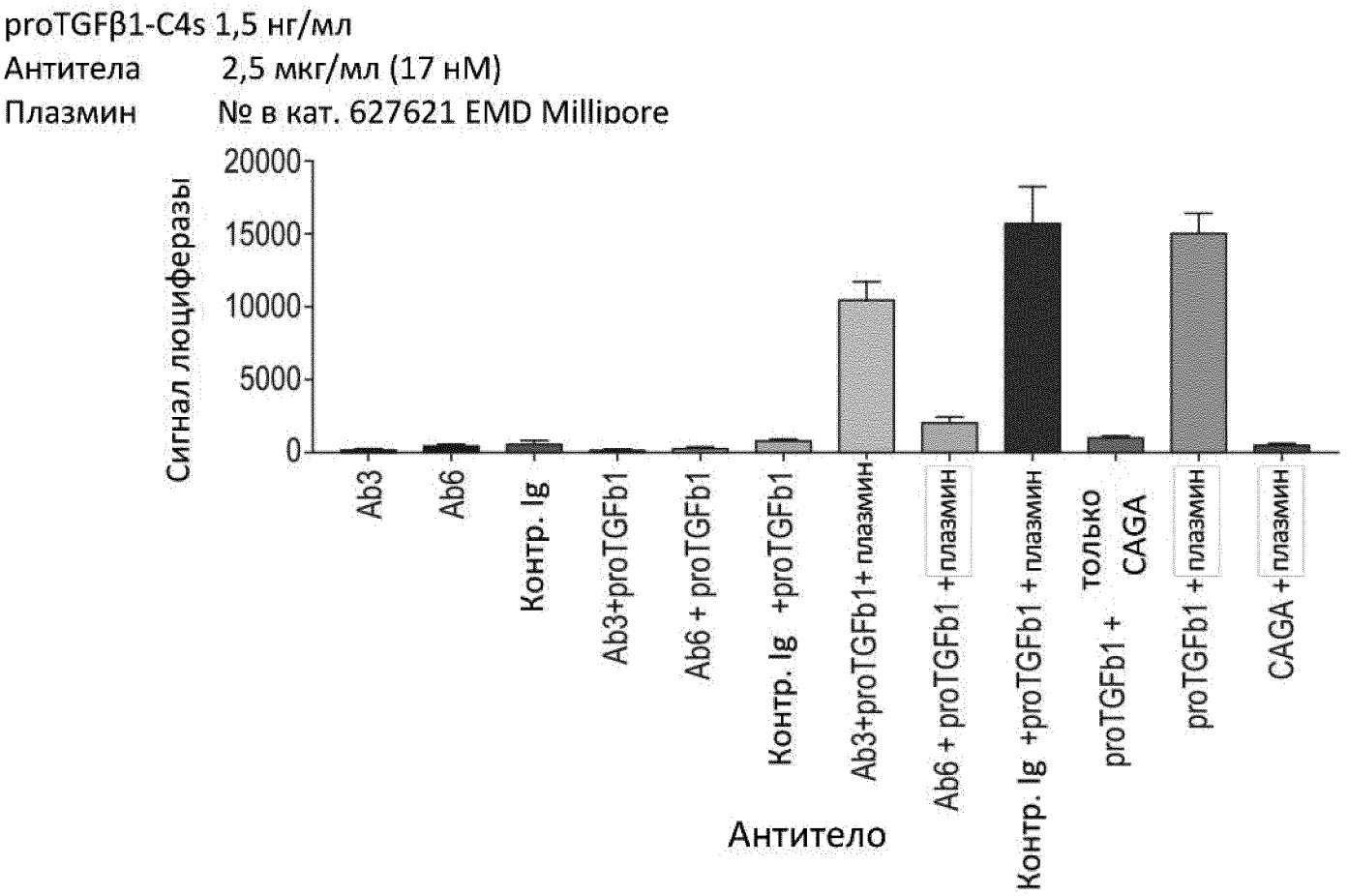

Активность TGFβ
(нормализ. по отнош. к носителю)
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0.01
0.1
1
10
100
Антитело (нМ)
Контрольный Ig
Ab4
Ab3
Ab5
Ab6

Фиг. 5A

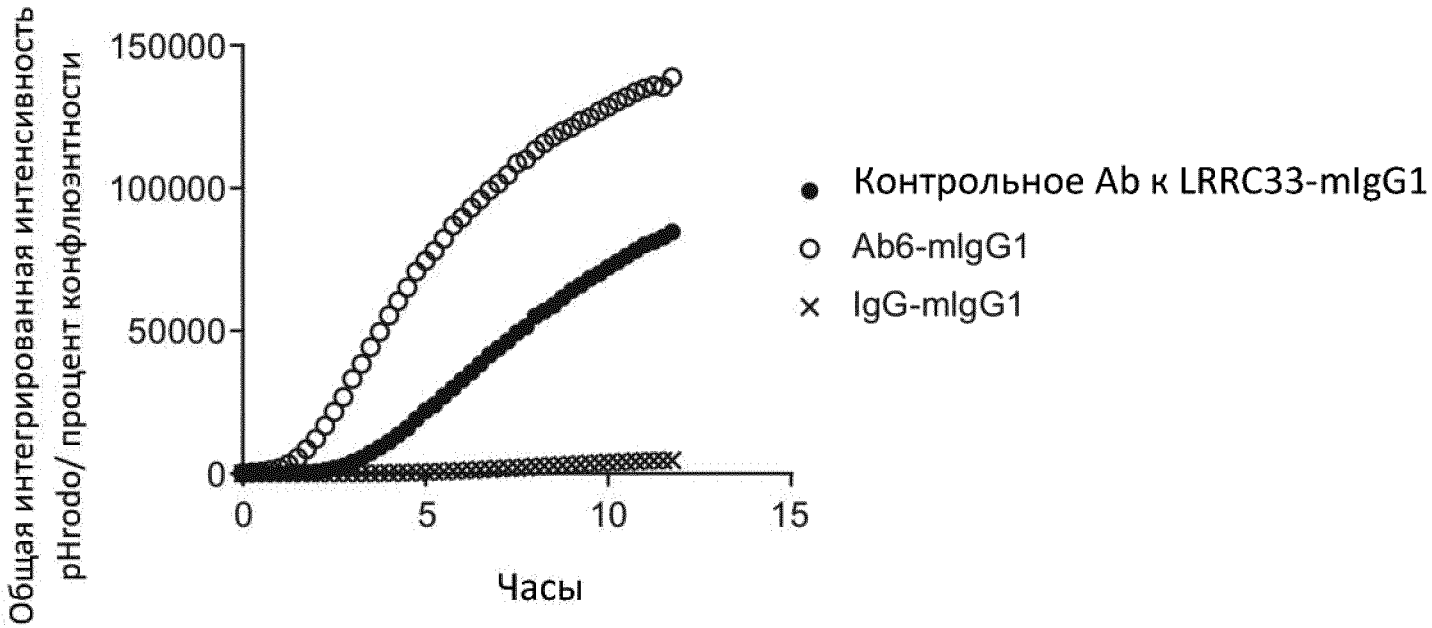
proTGFβ1-C4s 1,5 нг/мл
Антитела 2,5 мкг/мл (17 нМ)
Калликреин № в кат. 420307 500 нг/мл



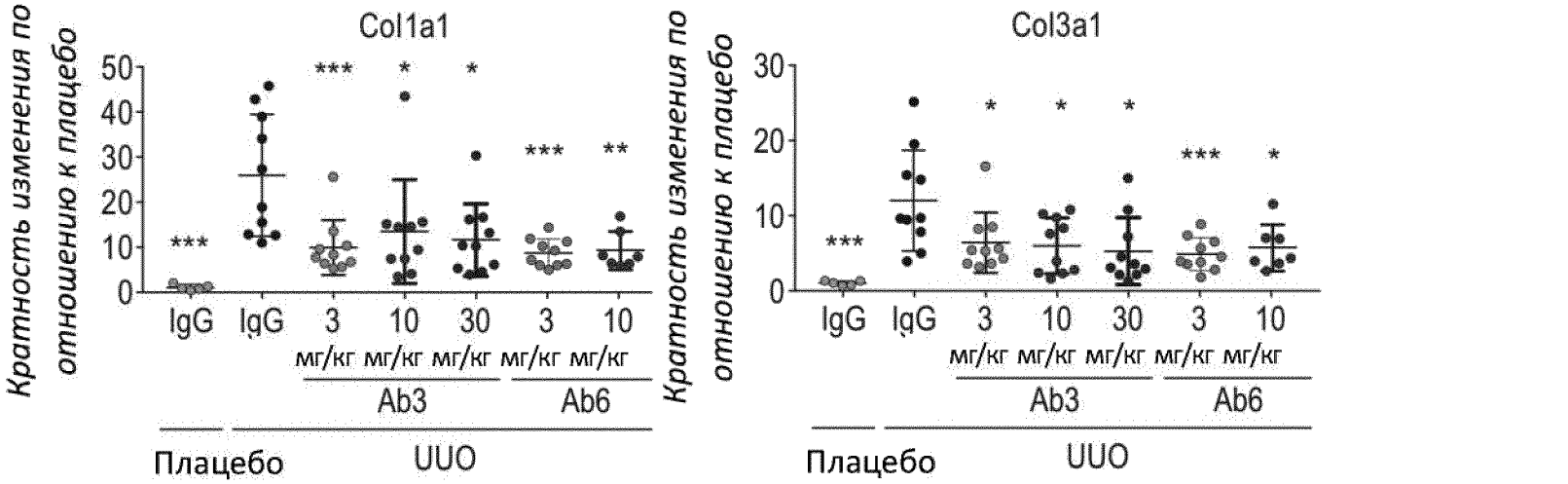
Фиг. 5B


proTGFβ1-C4s 1,5 нг/мл
Антитела 2,5 мкг/мл (17 нМ)
Плазмин № в кат. 627621 EMD Millipore
Сигнал люциферазы
20000
15000
10000
5000
0
Ab3
Ab6
Контр. Ig
Ab3+proTGFb1
Ab6 + proTGFb1
Контр. Ig +proTGFb1
Ab3+proTGFb1+ плазмин
Ab6 + proTGFb1 +плазмин
Контр. Ig +proTGFb1 + плазмин
proTGFb1 + только CAGA
proTGFb1 + плазмин
CAGA + плазмин
Антитело

Фиг. 6

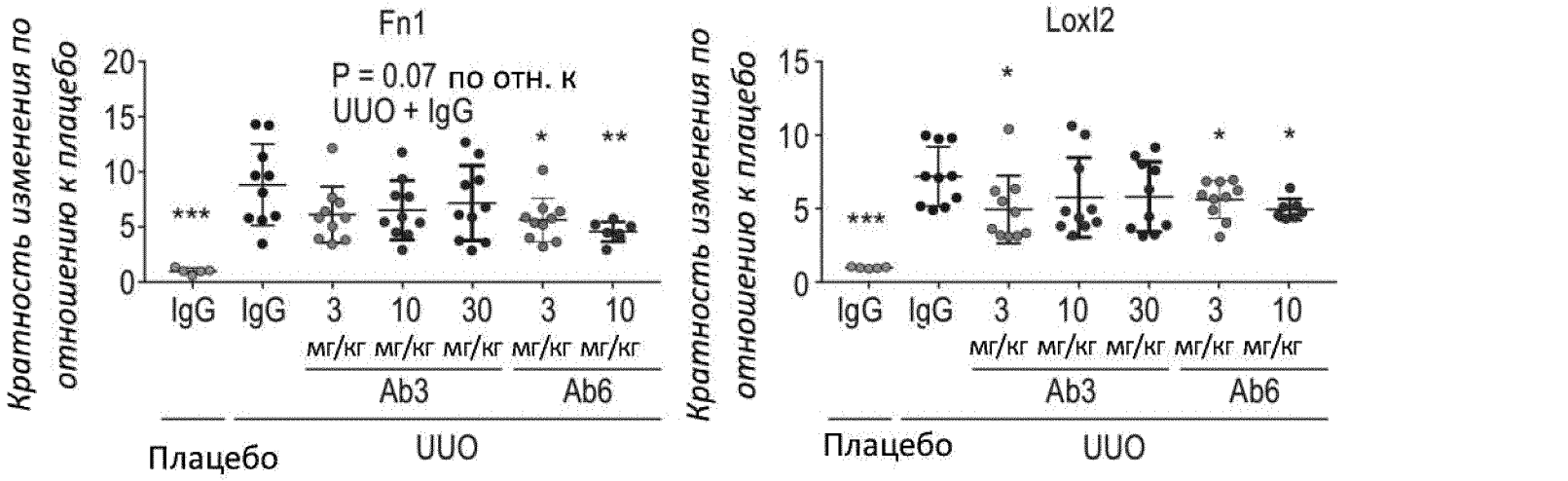

Общая интегрированная интенсивность
pHrodo/ процент конфлюэнтности
150000
100000
50000
0
0
5
10
15
Часы
Контрольное Ab к LRRC33-mIgG1
Ab6-mIgG1
IgG-mIgG1

Фиг. 7



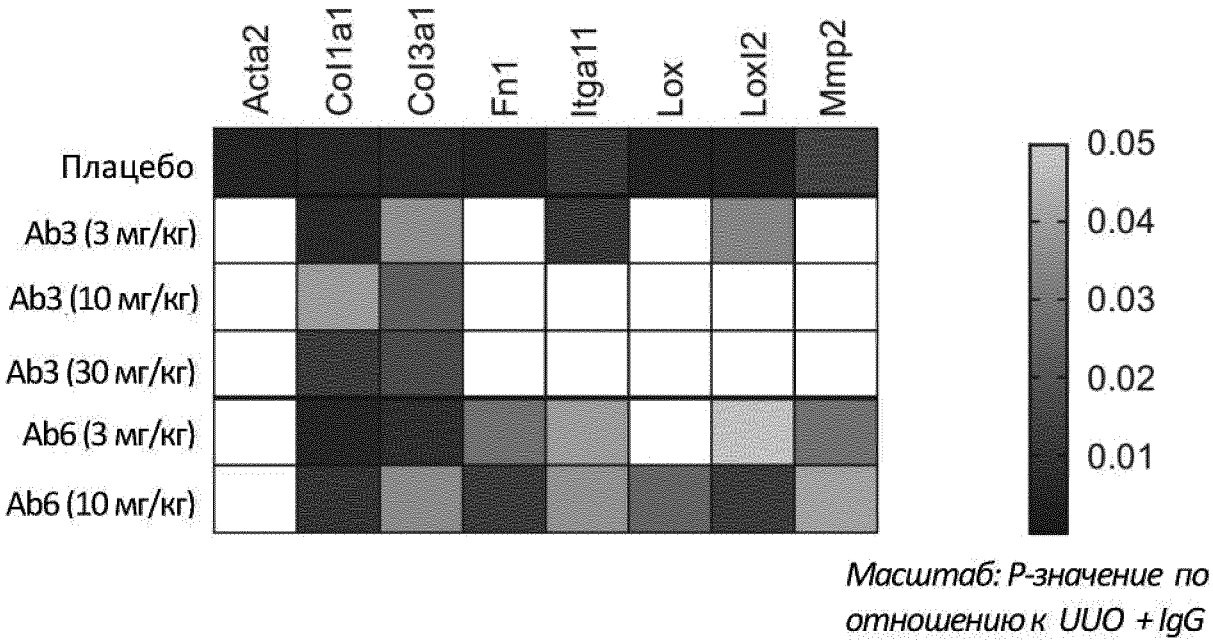
* P<0.05 по отн. к UUO + IgG
** P<0.01 по отн. к UUO + IgG
*** P<0.005 по отн. к UUO + IgG

Фиг. 8

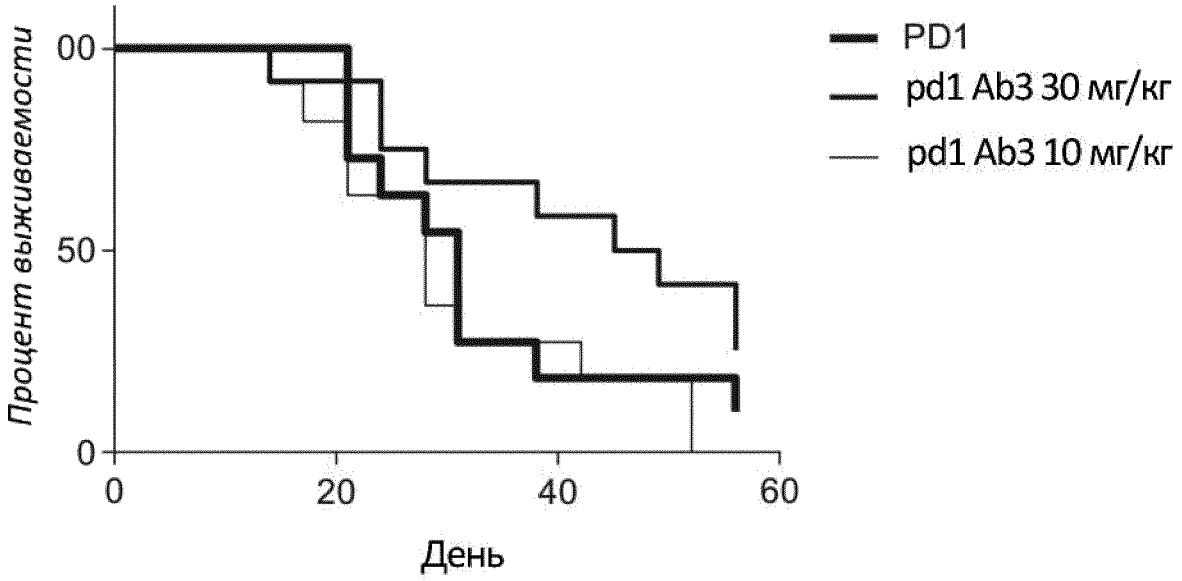


* P<0.05 по отн. к UUO + IgG
** P<0.01 по отн. к UUO + IgG
*** P<0.005 по отн. к UUO + IgG

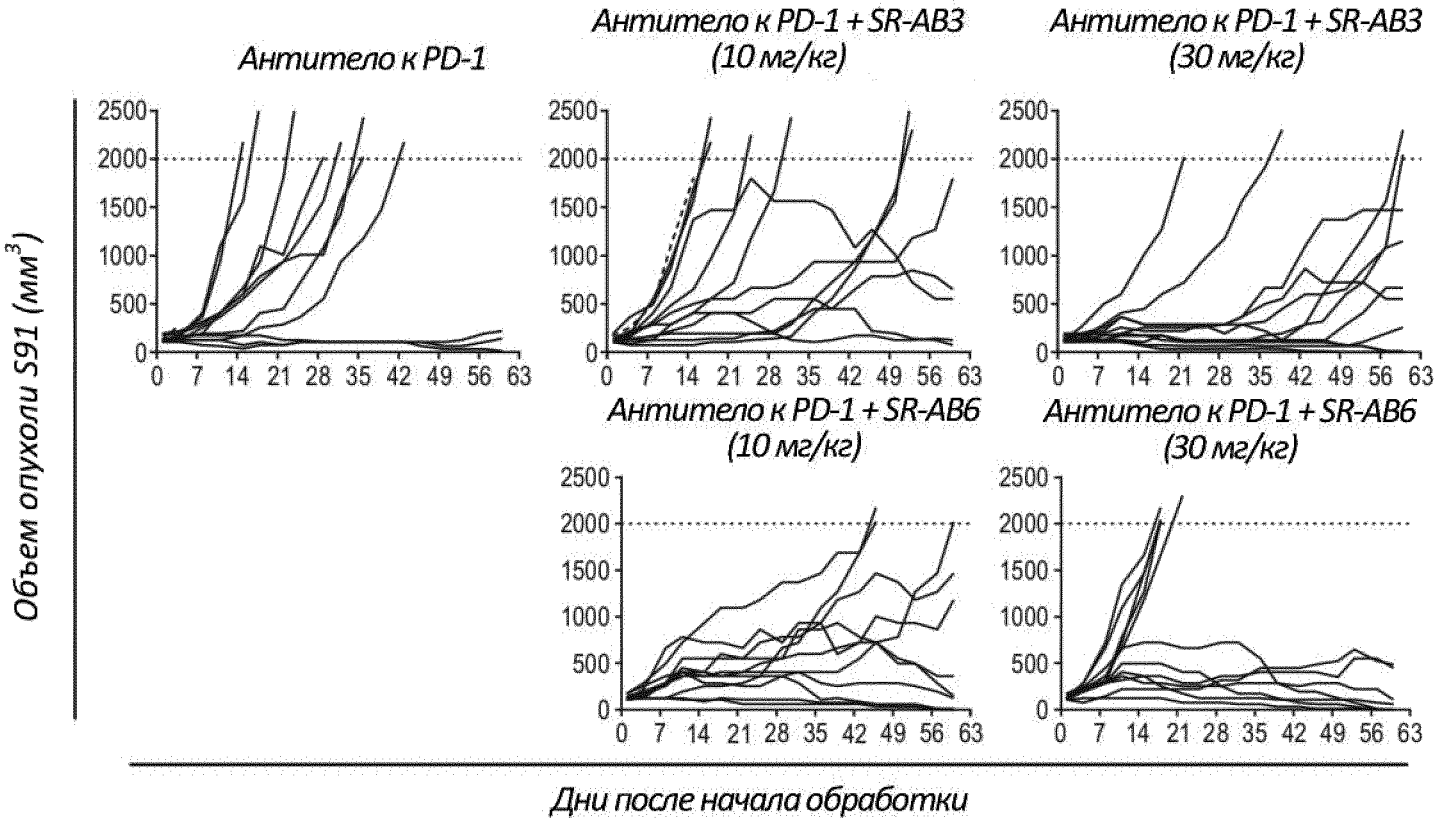
Фиг. 9


Acta2
Col1a1
Col3a1
Fn1
Itga11
Lox
Loxl2
Mmp2
Плацебо
Ab3 (3 мг/кг)
Ab3 (10 мг/кг)
Ab3 (30 мг/кг)
Ab6 (3 мг/кг)
Ab6 (10 мг/кг)
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
Масштаб: P-значение по отношению к UUO + IgG

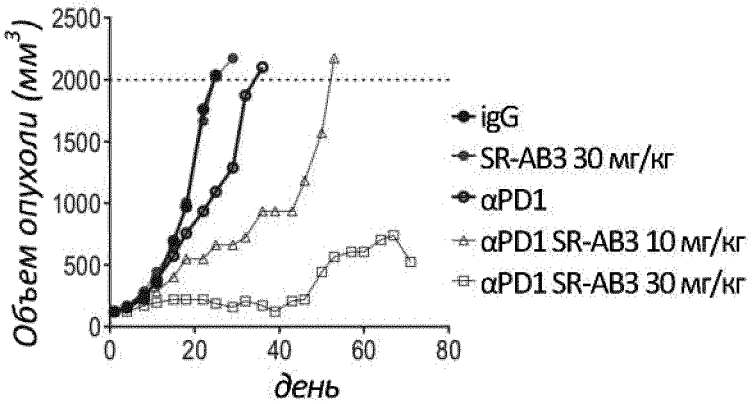
Фиг. 10


Процент выживаемости
00
50
0
0
20
40
60
День
PD1
pd1 Ab3 30 мг/кг
pd1 Ab3 10 мг/кг

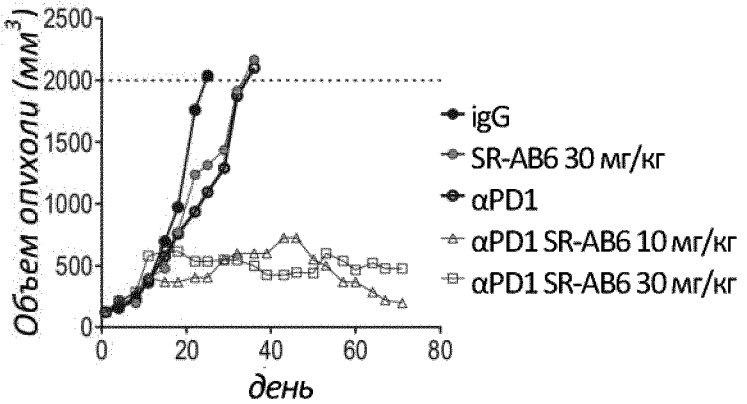
Фиг. 11А


Антитело к PD-1
Антитело к PD-1 + SR-AB3 (10 мг/кг)
Антитело к PD-1 + SR-AB3 (30 мг/кг)
Антитело к PD-1 + SR-AB6 (10 мг/кг)
Антитело к PD-1 + SR-AB6 (30 мг/кг)
Объем опухоли S91 (мм3)
0
500
1000
1500
2000
2500
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63
Дни после начала обработки

Фиг. 11B

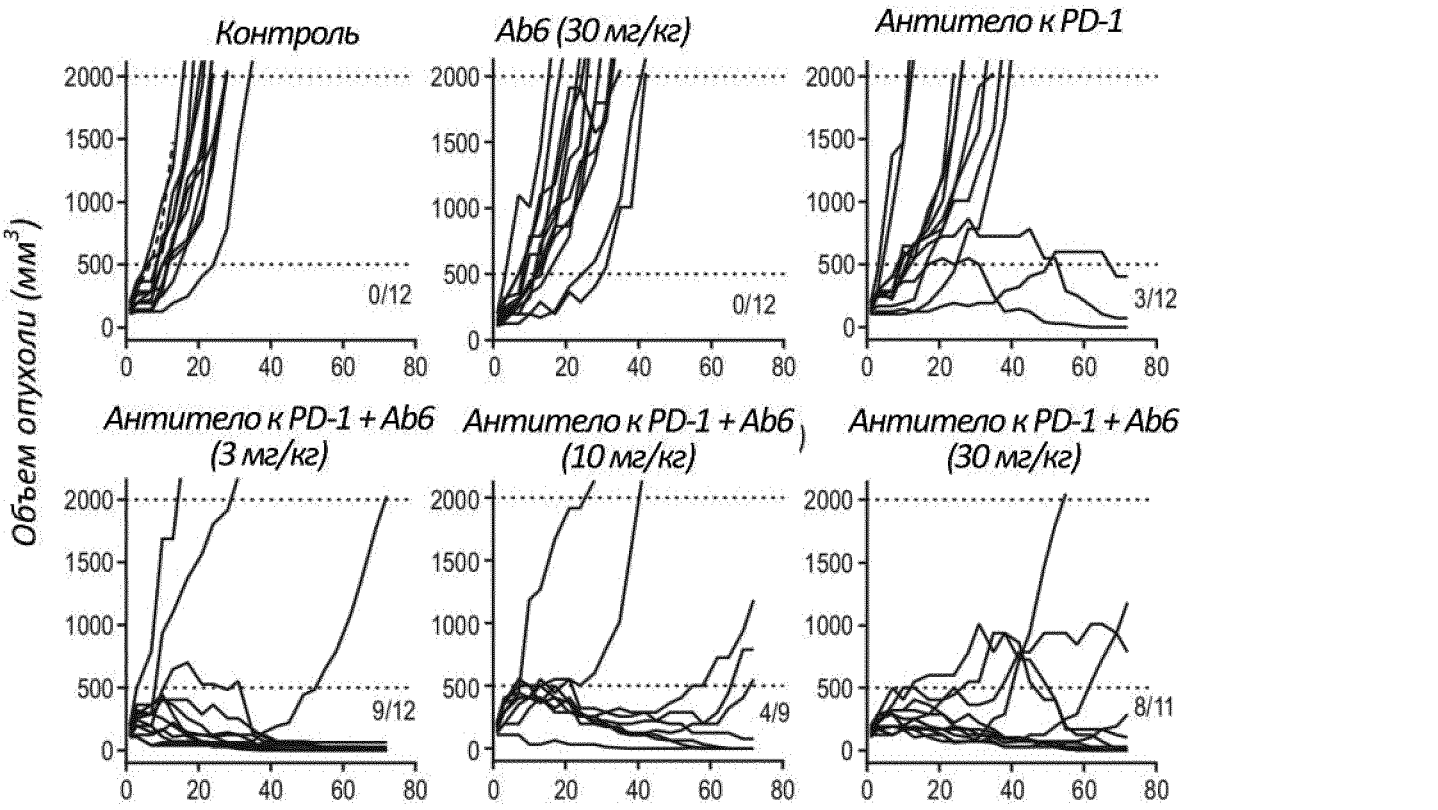


SR-AB3 (10 и 30 мг/кг)



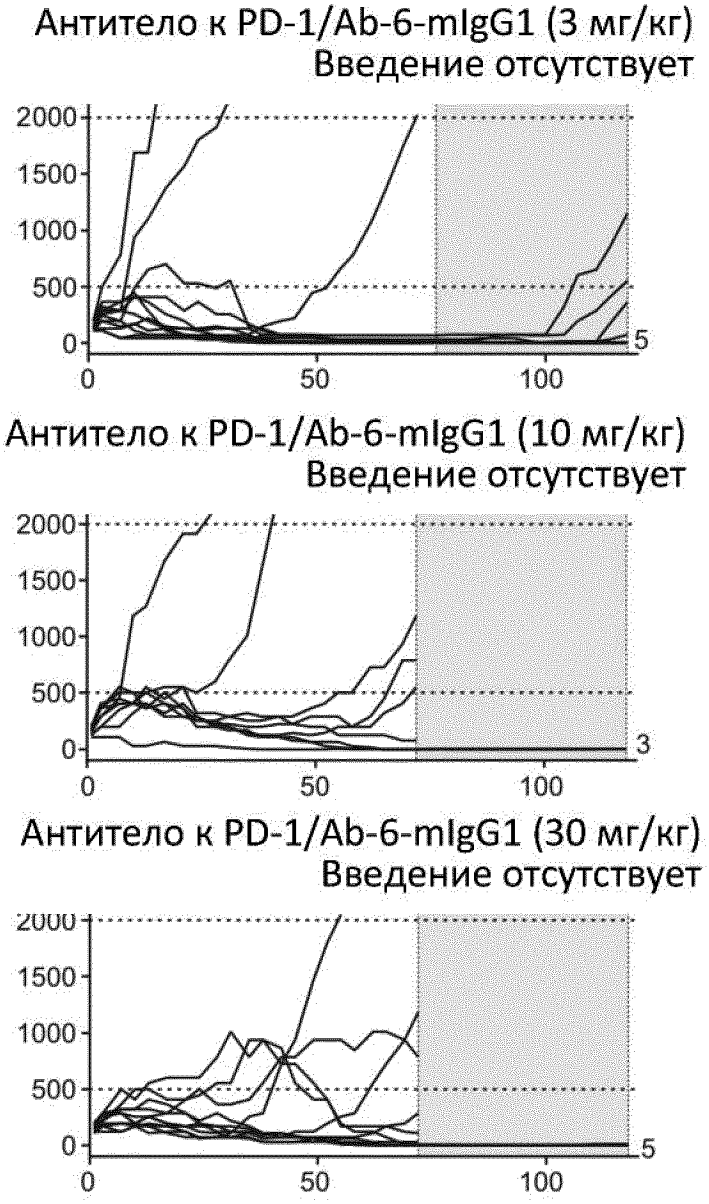
SR-AB6 (10 и 30 мг/кг)

Фиг. 11C

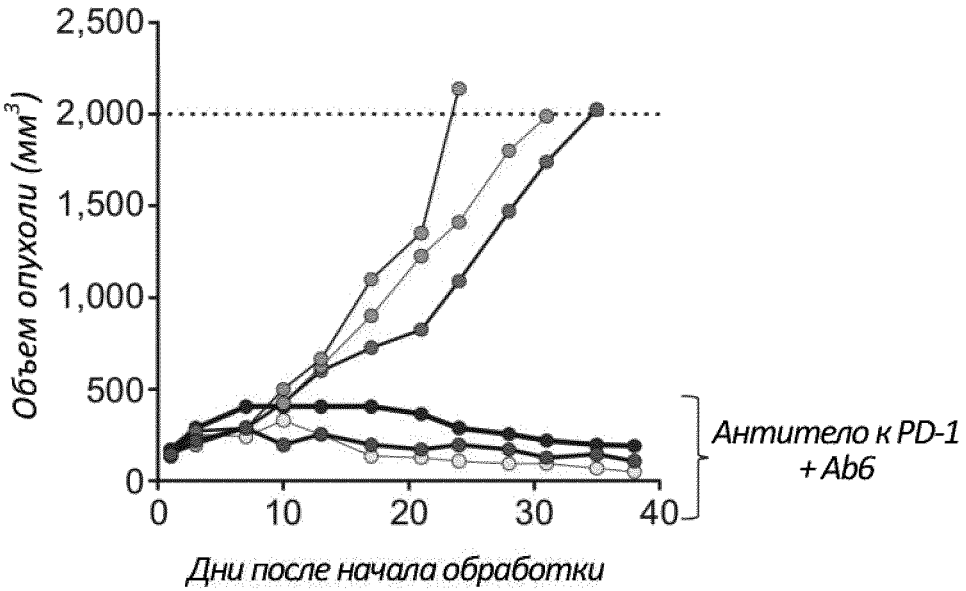


Респондеры: объем опухоли <25% от объема конечной точки в конце исследования

Фиг. 11D


Антитело к PD-1/Ab-6-mIgG1 (3 мг/кг)
Введение отсутствует
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
5
Антитело к PD-1/Ab-6-mIgG1 (10 мг/кг)
Введение отсутствует
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
3
Антитело к PD-1/Ab-6-mIgG1 (30 мг/кг)
Введение отсутствует
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
5

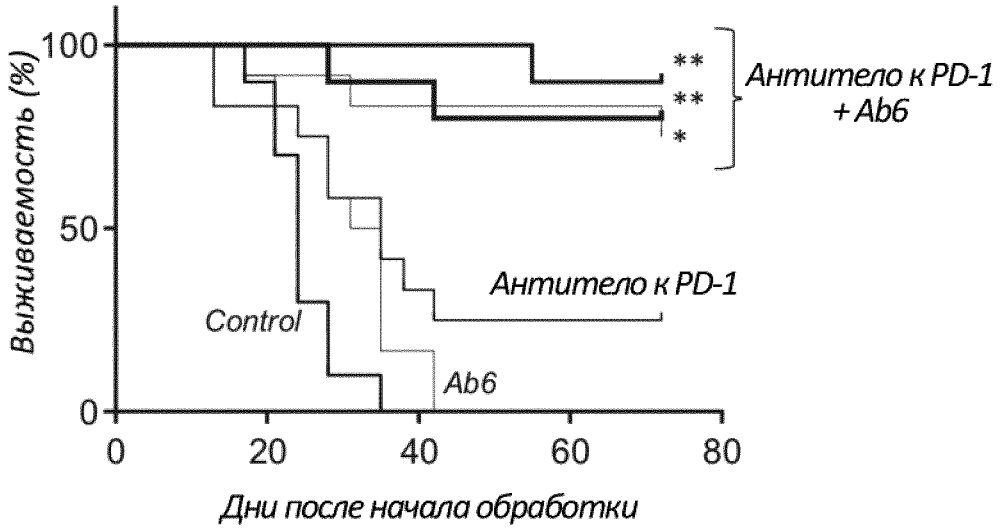
Фиг. 11E



**P<0,005, *P<0,05; логранговый (Мантеля-Кокса) критерий по отн. к антителу к PD-1

Схема исследования: клетки S91, имплантируемые подкожно. Обработку начинали, когда опухоли в среднем достигали 125-175 мм^3. Антитело к PD-1 (RMP-1-14), вводимое в дозе 10 мг/кг 2× в неделю; Ab6 (mIgG1), вводимое в дозе 3, 10 или 30 мг/кг один раз в неделю.

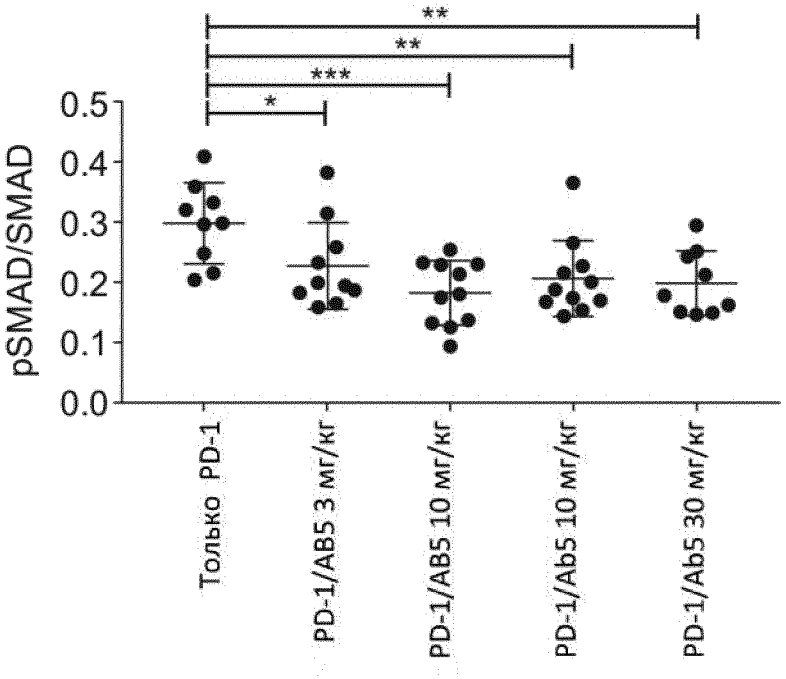
Фиг. 11F



**P<0,005, *P<0,05; логранговый (Мантеля-Кокса) критерий по отн. к антителу к PD-1

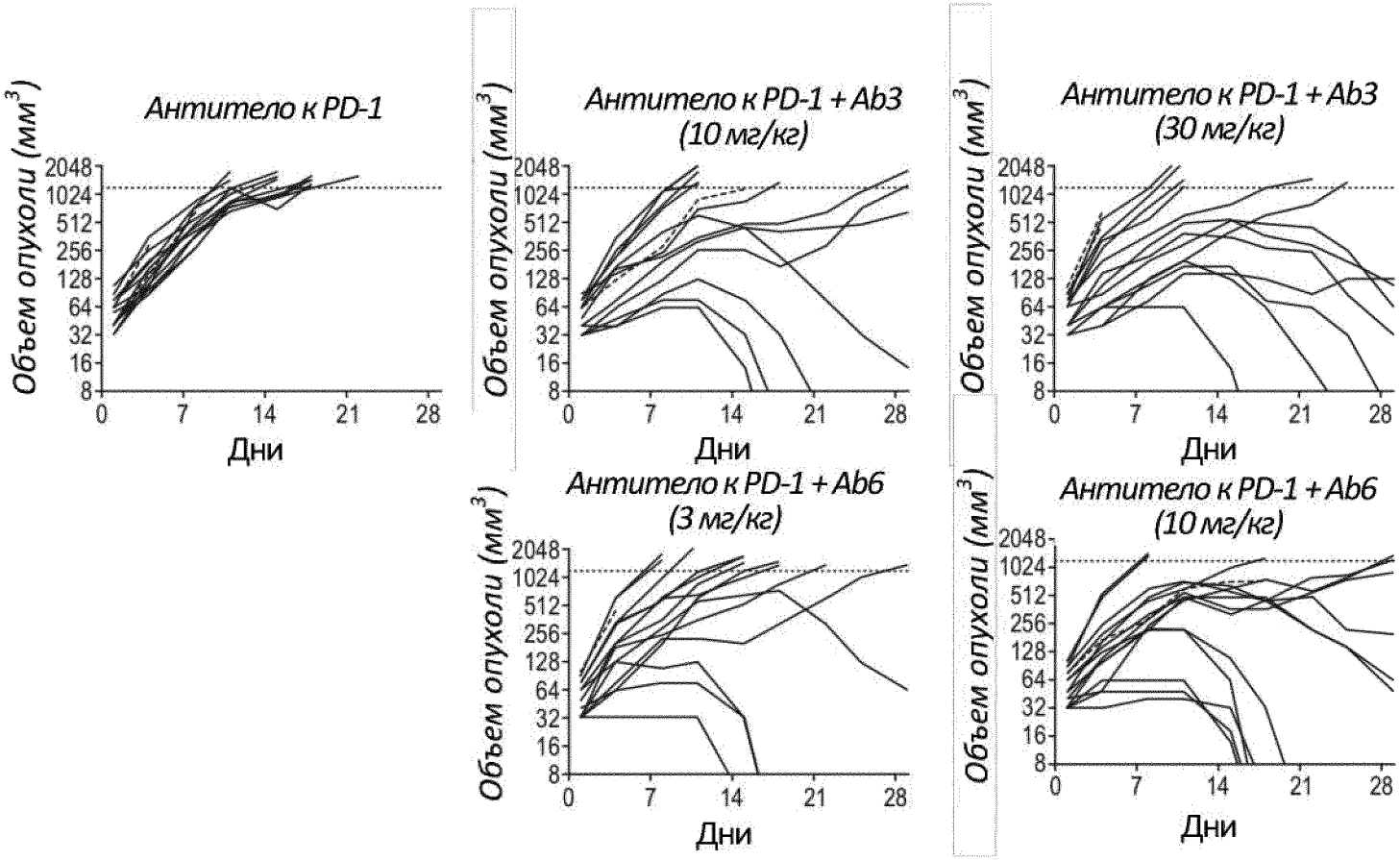
Схема исследования: клетки S91, имплантируемые подкожно. Обработку начинали, когда опухоли в среднем достигали 125-175 мм^3. Антитело к PD-1 (RMP-1-14), вводимое в дозе 10 мг/кг 2× в неделю; Ab6 (mIgG1), вводимое в дозе 3, 10 или 30 мг/кг один раз в неделю.

Фиг. 12

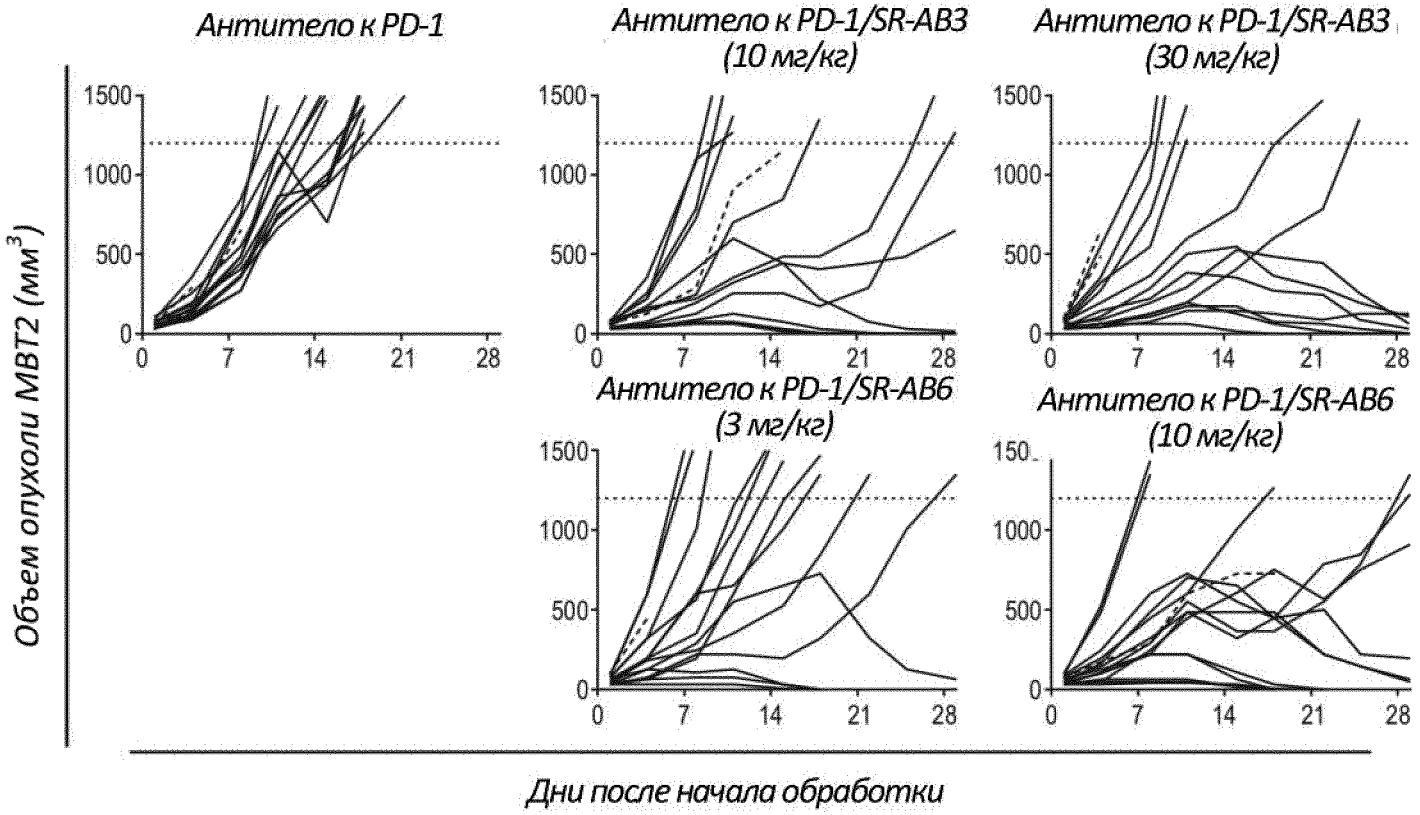


* p<0.05, **P<0.005 ***p<0.0005

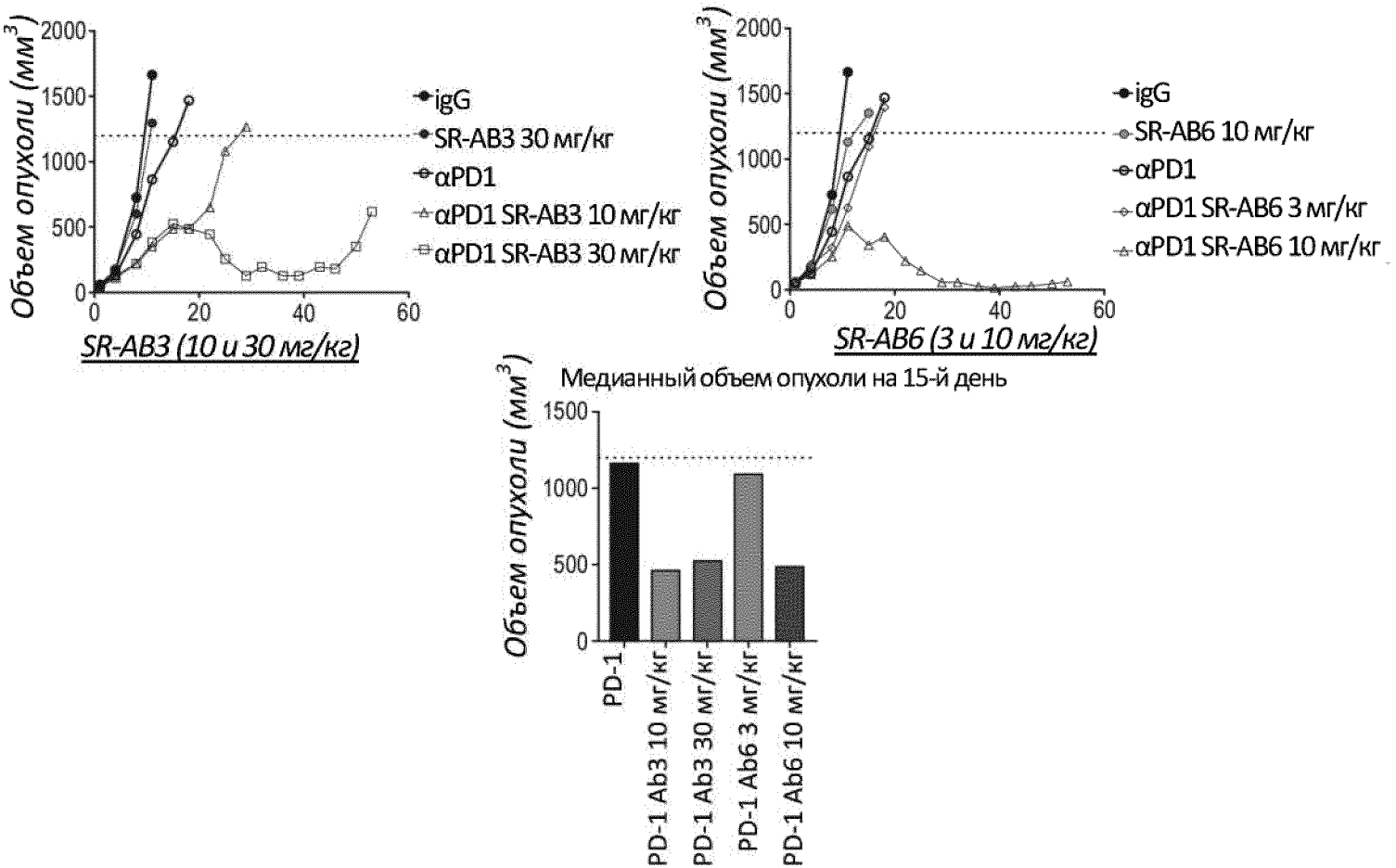
Фиг. 13А


Антитело к PD-1
Антитело к PD-1 + Ab3 (10 мг/кг)
Антитело к PD-1 + Ab3 (30 мг/кг)
Антитело к PD-1 + Ab6 (3 мг/кг)
Антитело к PD-1 + Ab6 (10 мг/кг)
Объем опухоли (мм3)
2048
1024
512
256
128
64
32
16
8
0
7
14
21
28
Дни

Фиг. 13B


Антитело к PD-1
Антитело к PD-1/SR-AB3 (10 мг/кг)
Антитело к PD-1/SR-AB3 (30 мг/кг)
Антитело к PD-1/SR-AB6 (3 мг/кг)
Антитело к PD-1/SR-AB6 (10 мг/кг)
Объем опухоли MBT2 (мм3)
Дни после начала обработки
0
500
1000
1500
0
7
14
21
28

Фиг. 13C


Объем опухоли (мм3)
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
SR-AB3 (10 и 30 мг/кг)
igG
SR-AB3 30 мг/кг
αPD1
αPD1 SR-AB3 10 мг/кг
αPD1 SR-AB3 30 мг/кг
Объем опухоли (мм3)
SR-AB6 (3 и 10 мг/кг)
igG
SR-AB6 10 мг/кг
αPD1
αPD1 SR-AB6 3 мг/кг
αPD1 SR-AB6 10 мг/кг
Медианный объем опухоли на 15-й день
Объем опухоли (мм3)
PD-1
PD-1 Ab3 10 мг/кг
PD-1 Ab3 30 мг/кг
PD-1 Ab6 3 мг/кг
PD-1 Ab6 10 мг/кг

Фиг. 13D

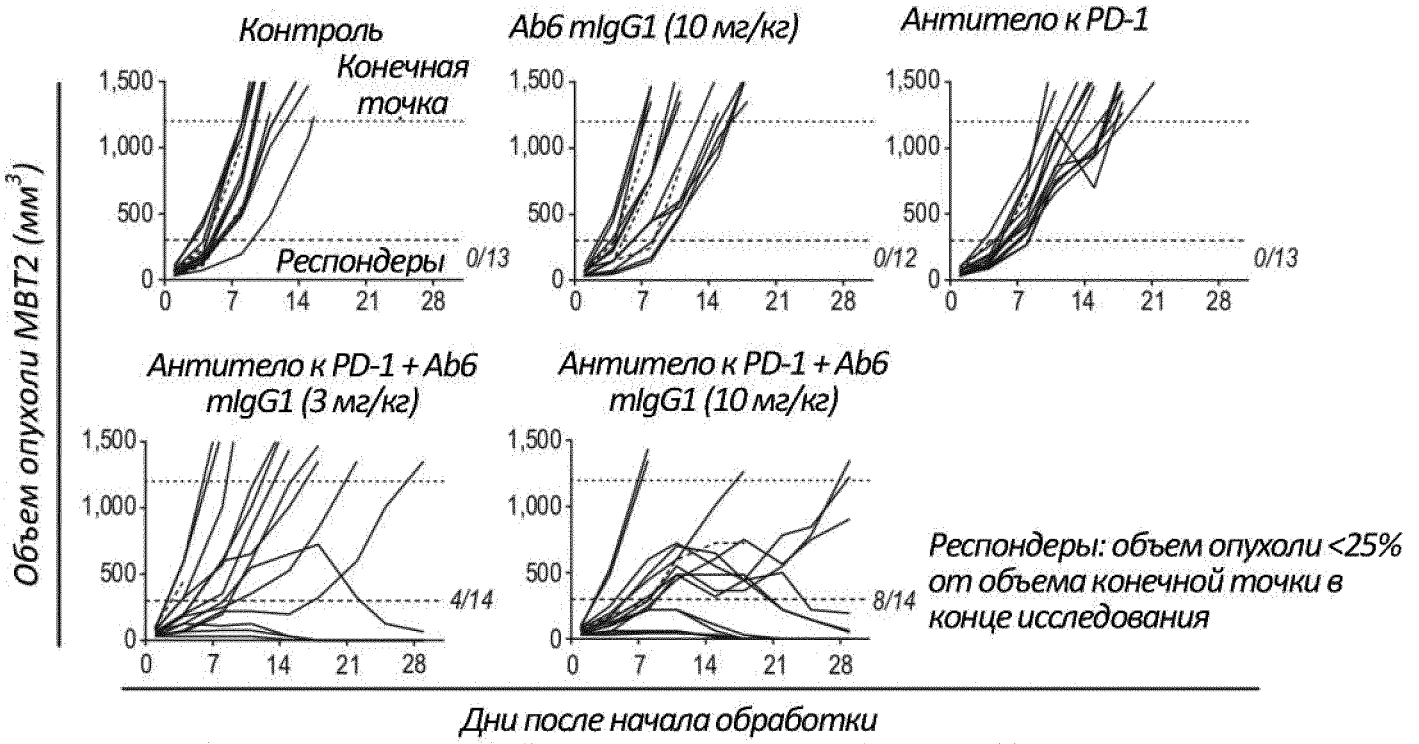
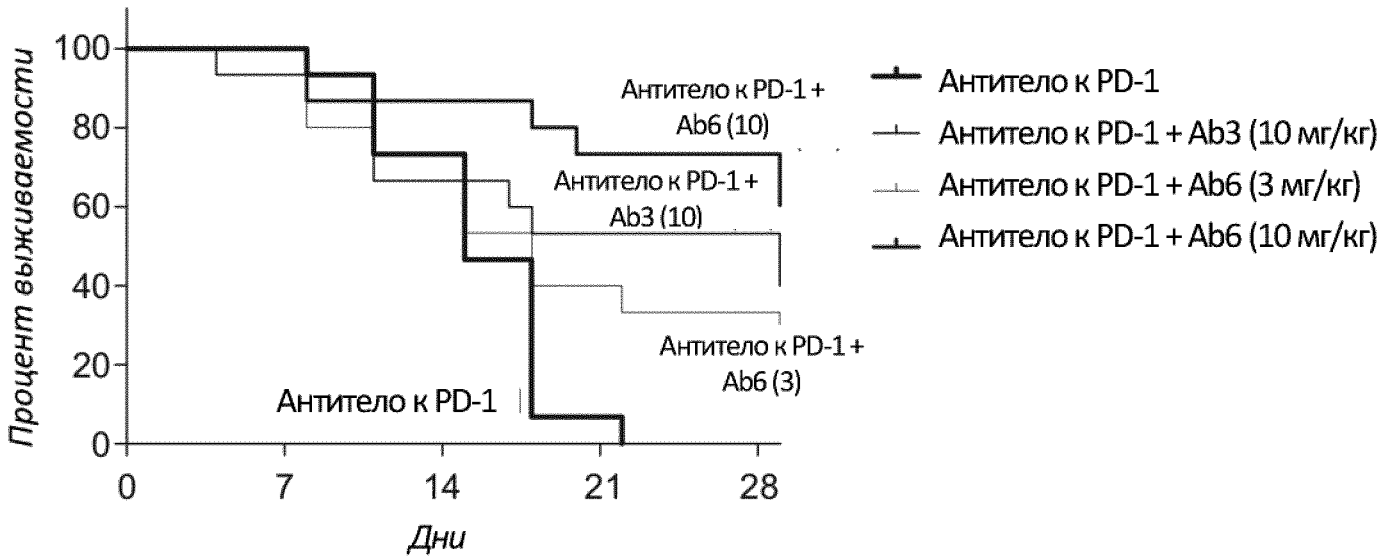
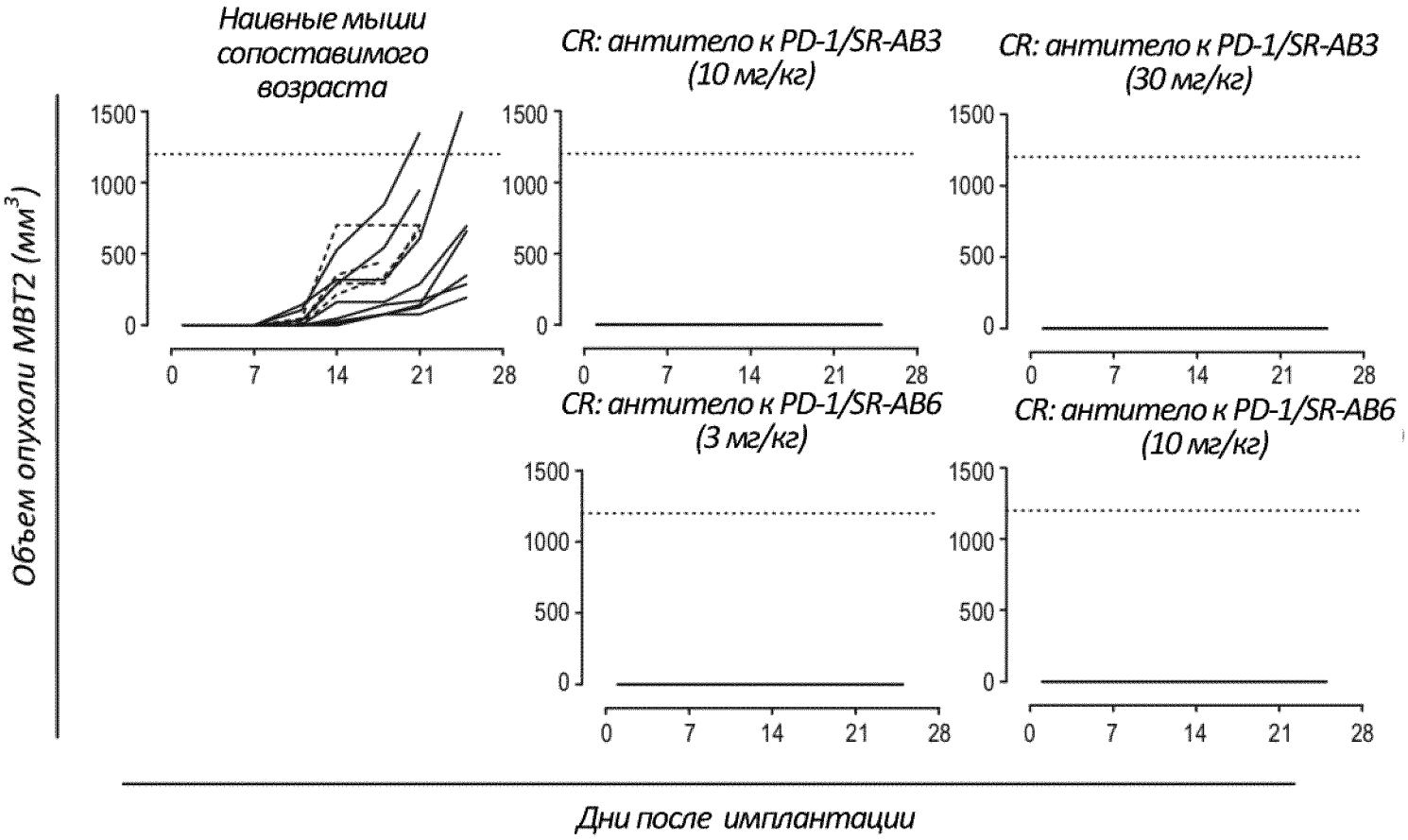


Схема исследования: клетки MBT-2, имплантируемые подкожно. Обработку начинали, когда опухоли в среднем достигали 40-80 мм^3. Антитело к PD-1 (RMP-1-14), вводимое в дозе 10 мг/кг 2× в неделю; Ab6, вводимое 1× в неделю в указанной дозе.

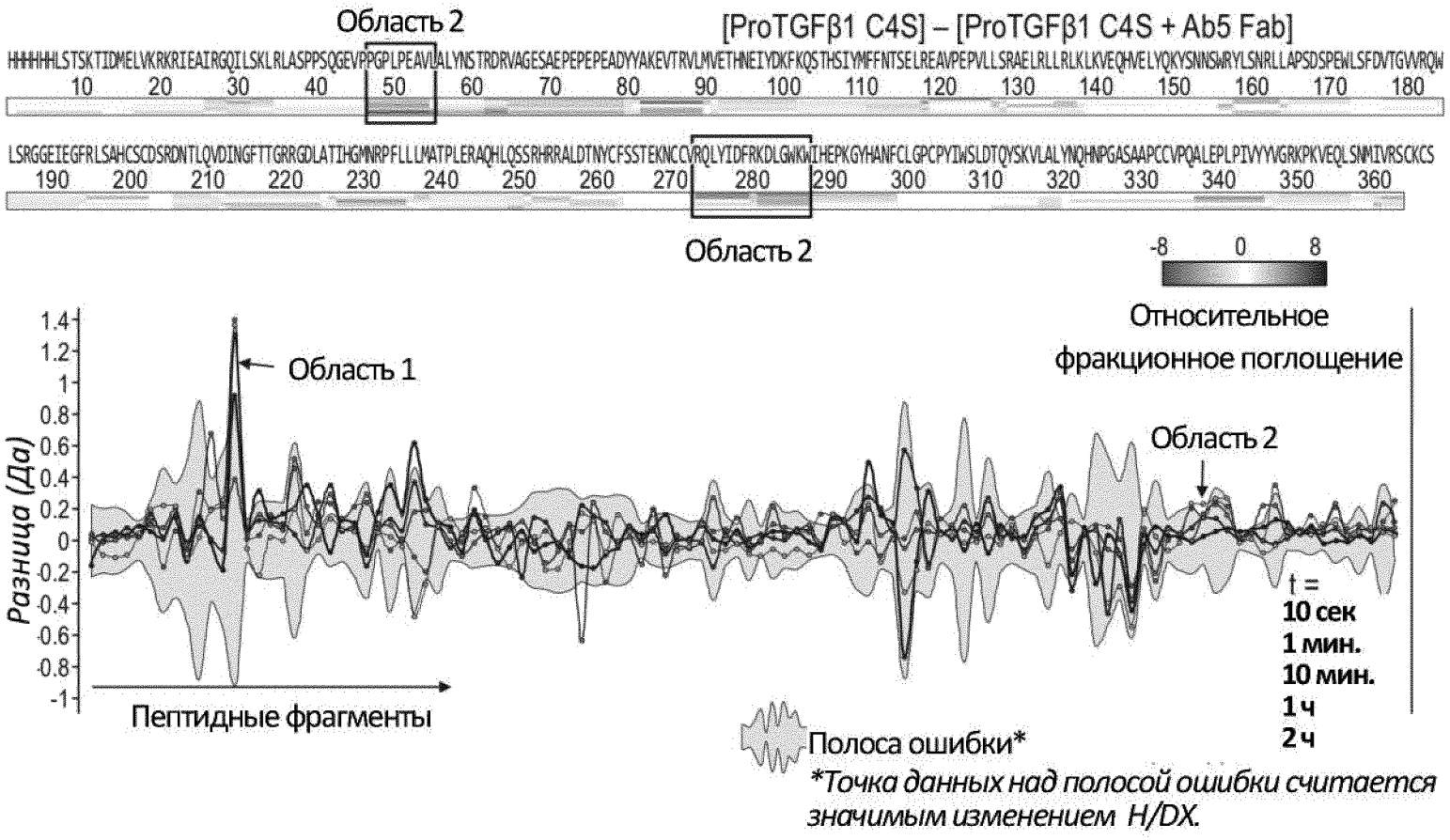
Фиг. 14


Процент выживаемости
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
Дни
Антитело к PD-1 + Ab6 (10)
Антитело к PD-1 + Ab3 (10)
Антитело к PD-1 + Ab6 (3)
Антитело к PD-1
Антитело к PD-1
Антитело к PD-1 + Ab3 (10 мг/кг)
Антитело к PD-1 + Ab6 (3 мг/кг)
Антитело к PD-1 + Ab6 (10 мг/кг)

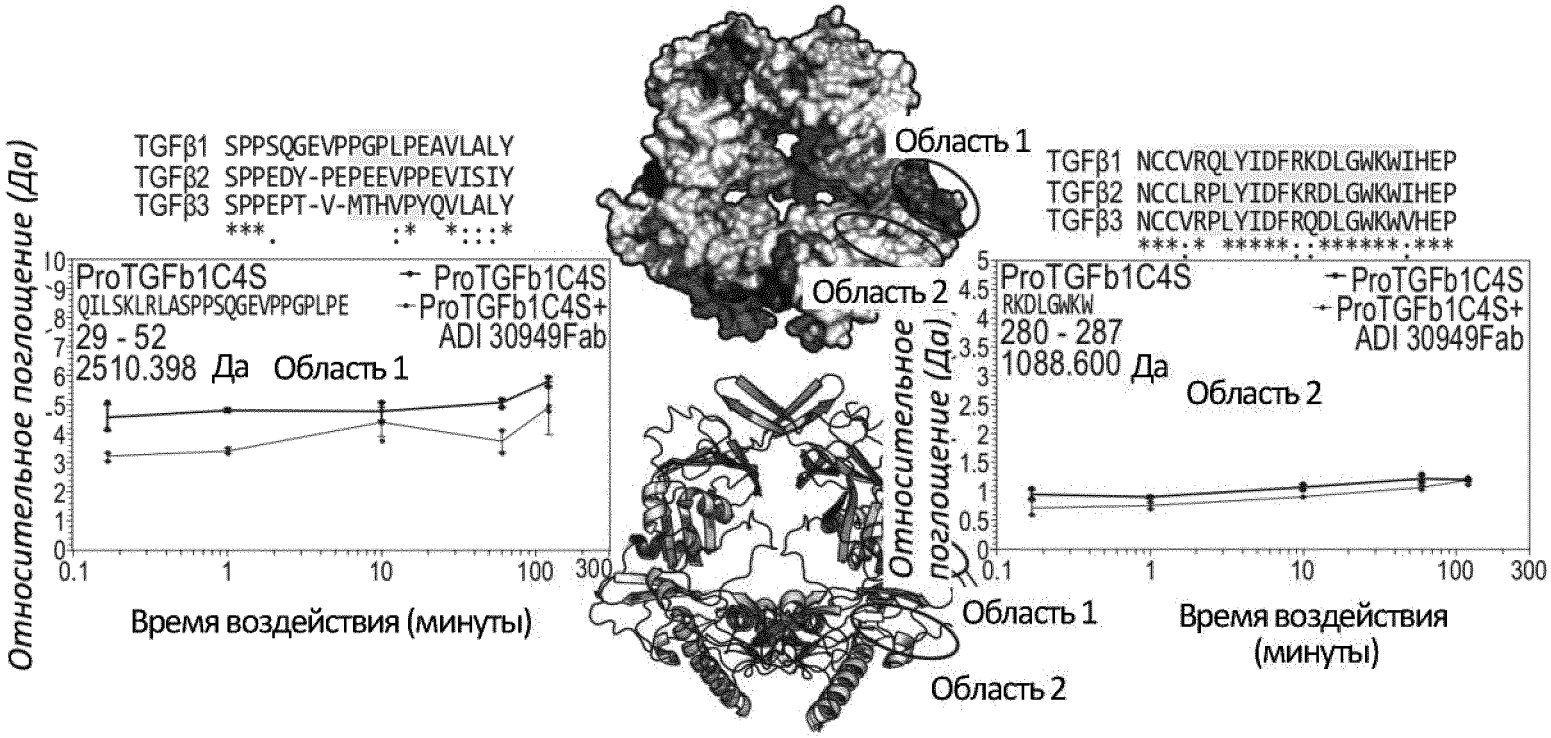
Фиг. 15


Наивные мыши сопоставимого возраста
CR: антитело к PD-1/SR-AB3 (10 мг/кг)
CR: антитело к PD-1/SR-AB3 (30 мг/кг)
CR: антитело к PD-1/SR-AB6 (3 мг/кг)
CR: антитело к PD-1/SR-AB6 (10 мг/кг)
Объем опухоли MBT2 (мм3)
Дни после имплантации
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28

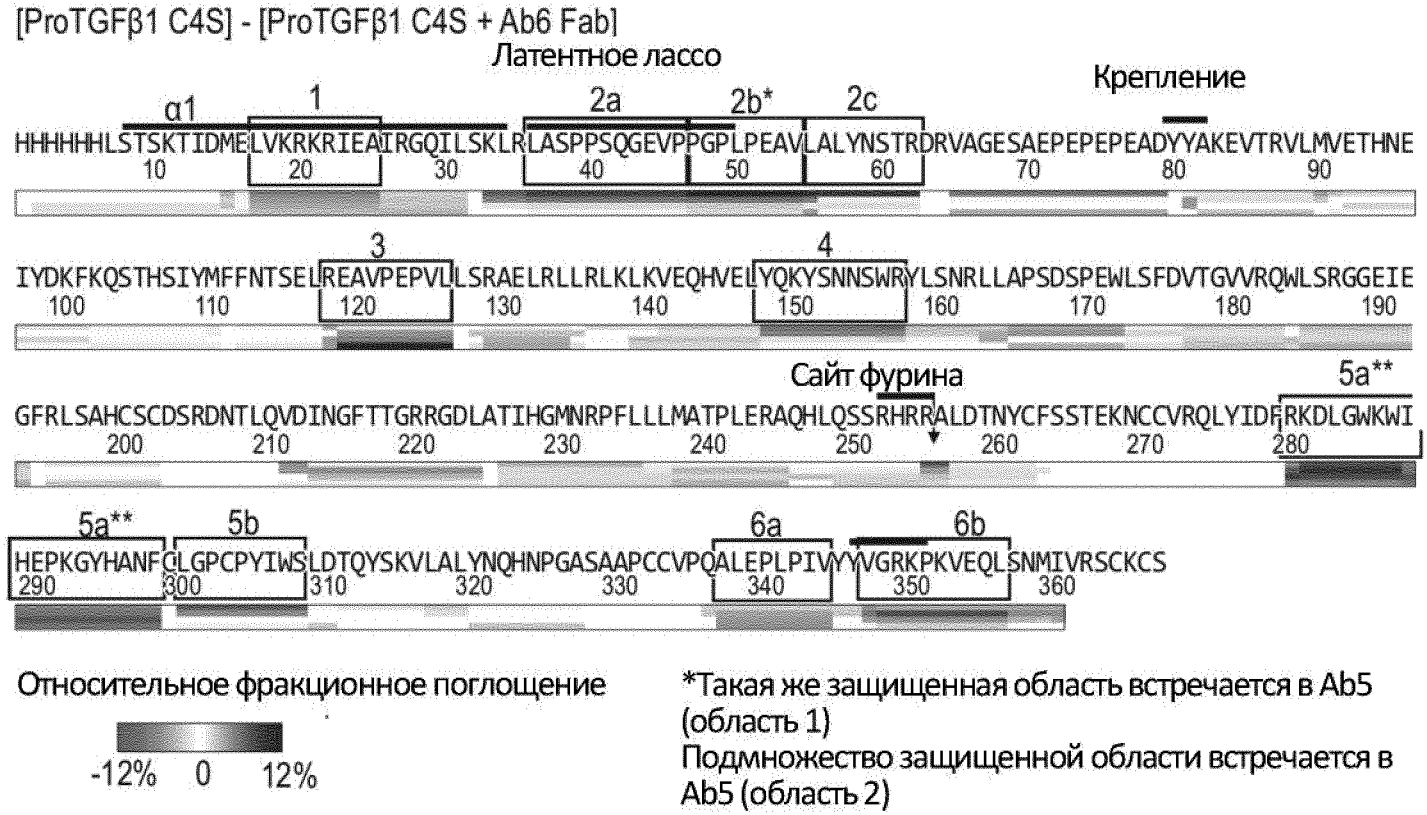
Фиг. 16


Область 2
[ProTGFβ1 C4S] – [ProTGFβ1 C4S + Ab5 Fab]
HHHHHHLSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQW
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180
LSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS
190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
Область 2
-8 0 8
Относительное фракционное поглощение
Область 1
Область 2
Разница (Да)
1.4 1.2 1 0.8 0.6 0.4 0.2 0 -0.2 -0.4 -0.6 -0.8 -1
Пептидные фрагменты
t =
10 сек
1 мин.
10 мин.
1 ч
2 ч
Полоса ошибки*
*Точка данных над полосой ошибки считается значимым изменением H/DX.

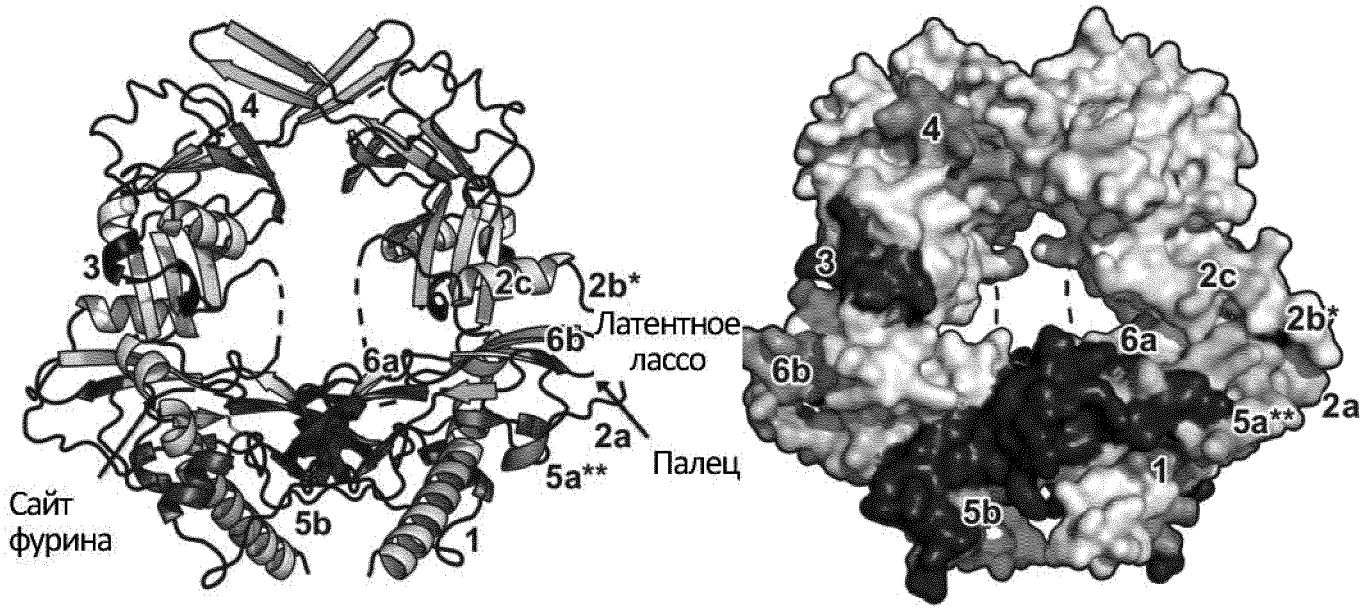
Фиг. 17


TGFβ1 SPPSQGEVPPGPLPEAVLALY
TGFβ2 SPPEDY-PEPEEVPPEVISIY
TGFβ3 SPPEPT-V-MTHVPYQVLALY
ProTGFb1C4S
QILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPE
29 - 52
2510.398 Да
Область 1
ProTGFb1C4S
ProTGFb1C4S+
ADI 30949Fab
Относительное поглощение (Да)
Время воздействия (минуты)
Область 1
Область 2
TGFβ1 NCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEP
TGFβ2 NCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEP
TGFβ3 NCCVRPLYIDFRQDLGWKWVHEP
ProTGFb1C4S
RKDLGWKW
280 - 287
1088.600 Да
Область 2
ProTGFb1C4S
ProTGFb1C4S+
ADI 30949Fab
Относительное поглощение (Да)
Время воздействия (минуты)

Фиг. 18A

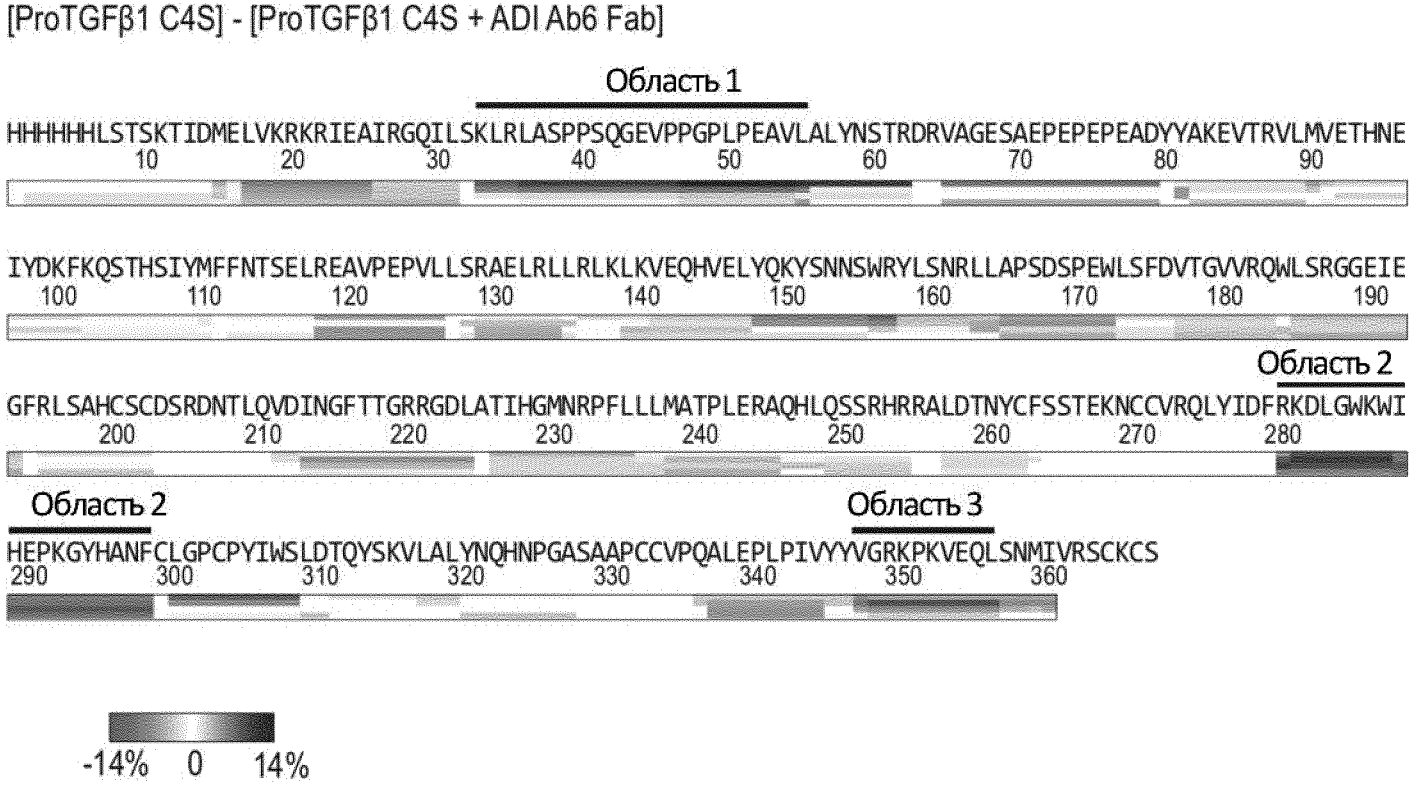

[ProTGFβ1 C4S] - [ProTGFβ1 C4S + Ab6 Fab]
Латентное лассо
Крепление
α1
1
2a
2b*
2c
HHHHHHLSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNE
10 20 30 40 50 60 70 80 90
3
4
IYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIE
100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
Сайт фурина
5a**
GFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWI
200 210 220 230 240 250 260 270 280
5a**
5b
6a
6b
HEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS
290 300 310 320 330 340 350 360
Относительное фракционное поглощение
-12% 0 12%
*Такая же защищенная область встречается в Ab5 (область 1)
Подмножество защищенной области встречается в Ab5 (область 2)

Фиг. 18B



*Такая же защищенная область встречается в Ab5 (область 1)
Подмножество защищенной области встречается в Ab5
(область 2)

Фиг. 19A


[ProTGFβ1 C4S] - [ProTGFβ1 C4S + ADI Ab6 Fab]
Область 1
HHHHHHLSTSKTIDMELVKRKRIEAIRGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNE
10 20 30 40 50 60 70 80 90
IYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIE
100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
Область 2
GFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWI
200 210 220 230 240 250 260 270 280
Область 2
Область 3
HEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS
290 300 310 320 330 340 350 360
-14% 0 14%

Фиг. 19B



Область 1 . . ..

```
ProTGFβ1: KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVL
ProTGFβ2: KLKLTSPPEDY-PEPEEVPPEVI
ProTGFβ3: KLRLTSPPEPT-V-MTHVPYQVL
```

Область 2 . . .

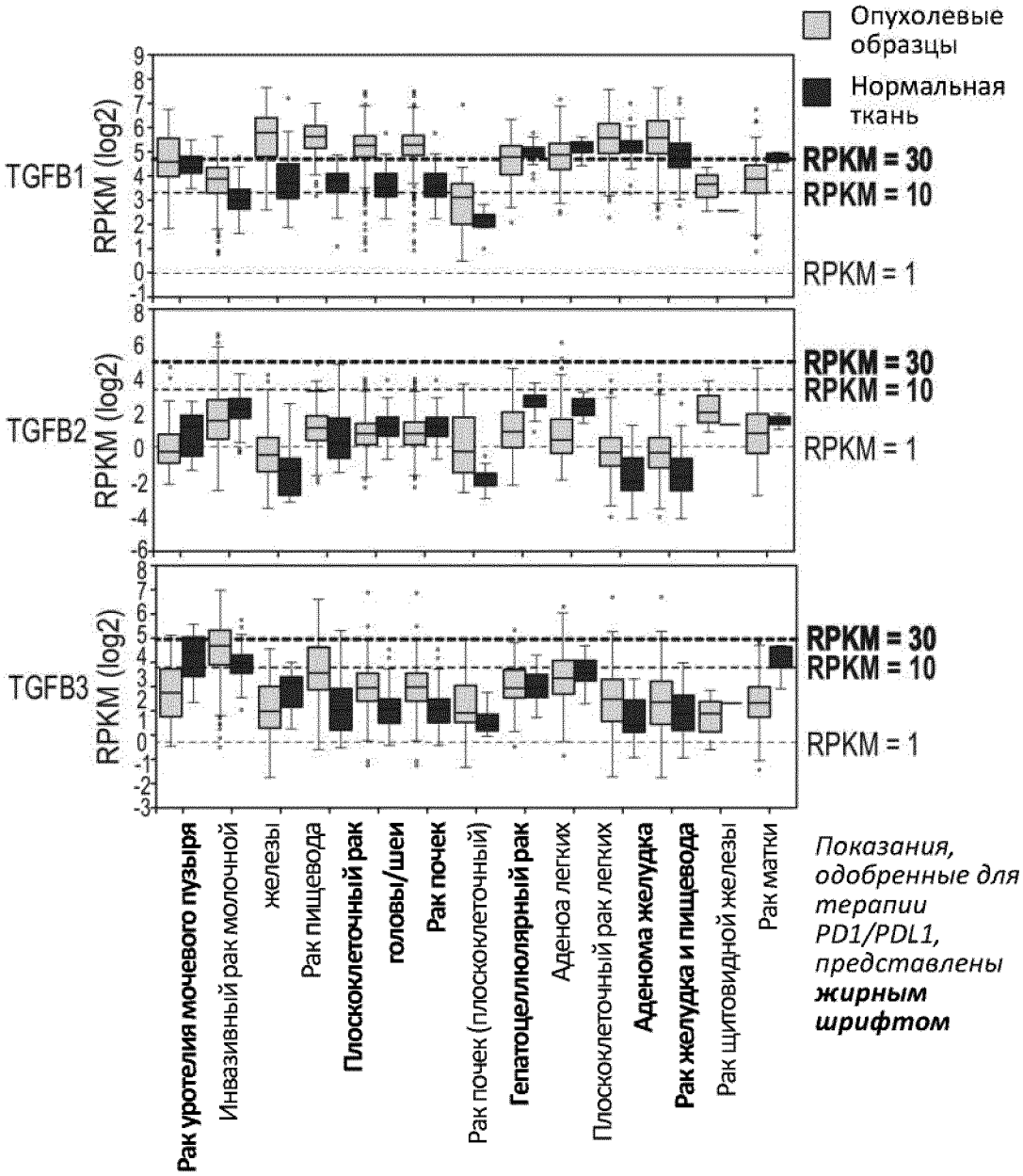
```
ProTGFβ1: RKDLGWKWIHEPKGYHANF
ProTGFβ2: KRDLGWKWIHEPKGYNANF
ProTGFβ3: RQDLGWKWVHEPKGYYANF
```

Область 3 . .. .

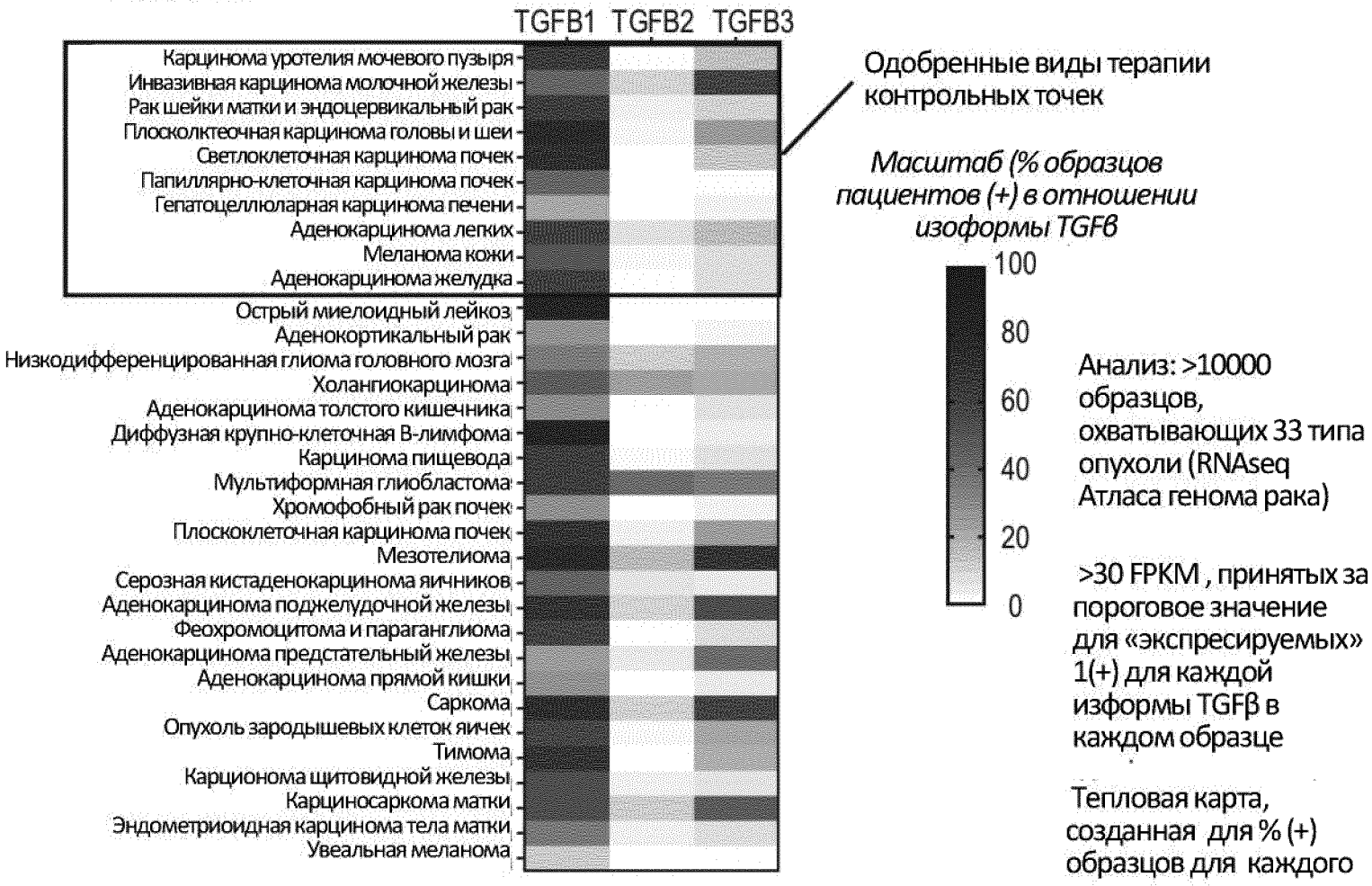
```
ProTGFβ1: VGRKPKVEQL
ProTGFβ2: IGKTPKIEQL
ProTGFβ3: VGRTPKVEQL
```

Точки (•) представляют собой разнообразие аминокислотной последовательности в изоформах proTGFβ

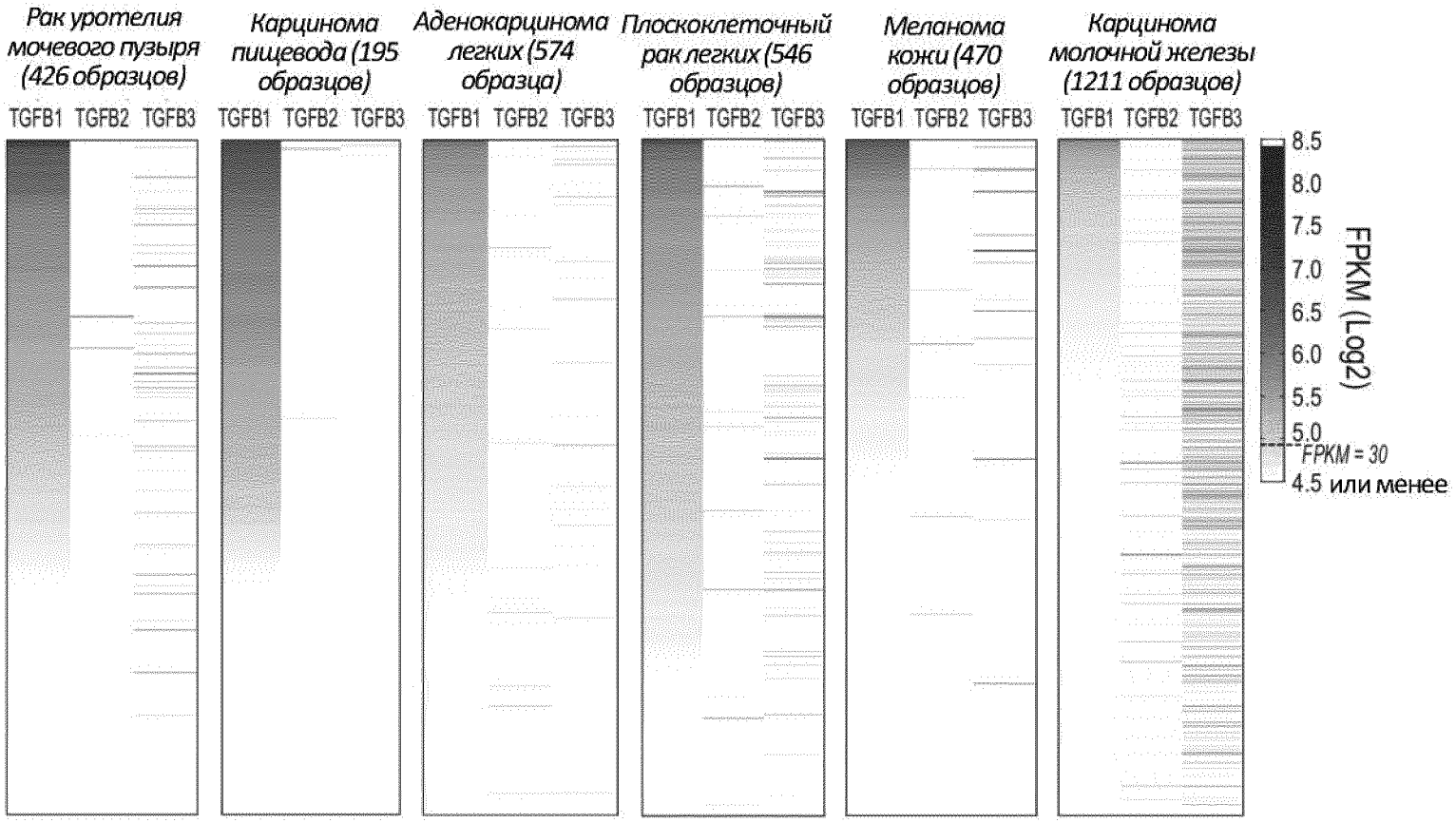
Фиг. 20А


Опухолевые образцы
Нормальная ткань
TGFB1
RPKM (log2)
TGFB2
RPKM (log2)
TGFB3
RPKM (log2)
RPKM = 30
RPKM = 10
RPKM = 1
Рак уротелия мочевого пузыря
Инвазивный рак молочной железы
Рак пищевода
Плоскоклеточный рак головы/шеи
Рак почек
Рак почек (плоскоклеточный)
Гепатоцеллюлярный рак
Аденоа легких
Плоскоклеточный рак легких
Аденома желудка
Рак желудка и пищевода
Рак щитовидной железы
Рак матки
Показания, одобренные для терапии PD1/PDL1, представлены жирным шрифтом

Фиг. 20B

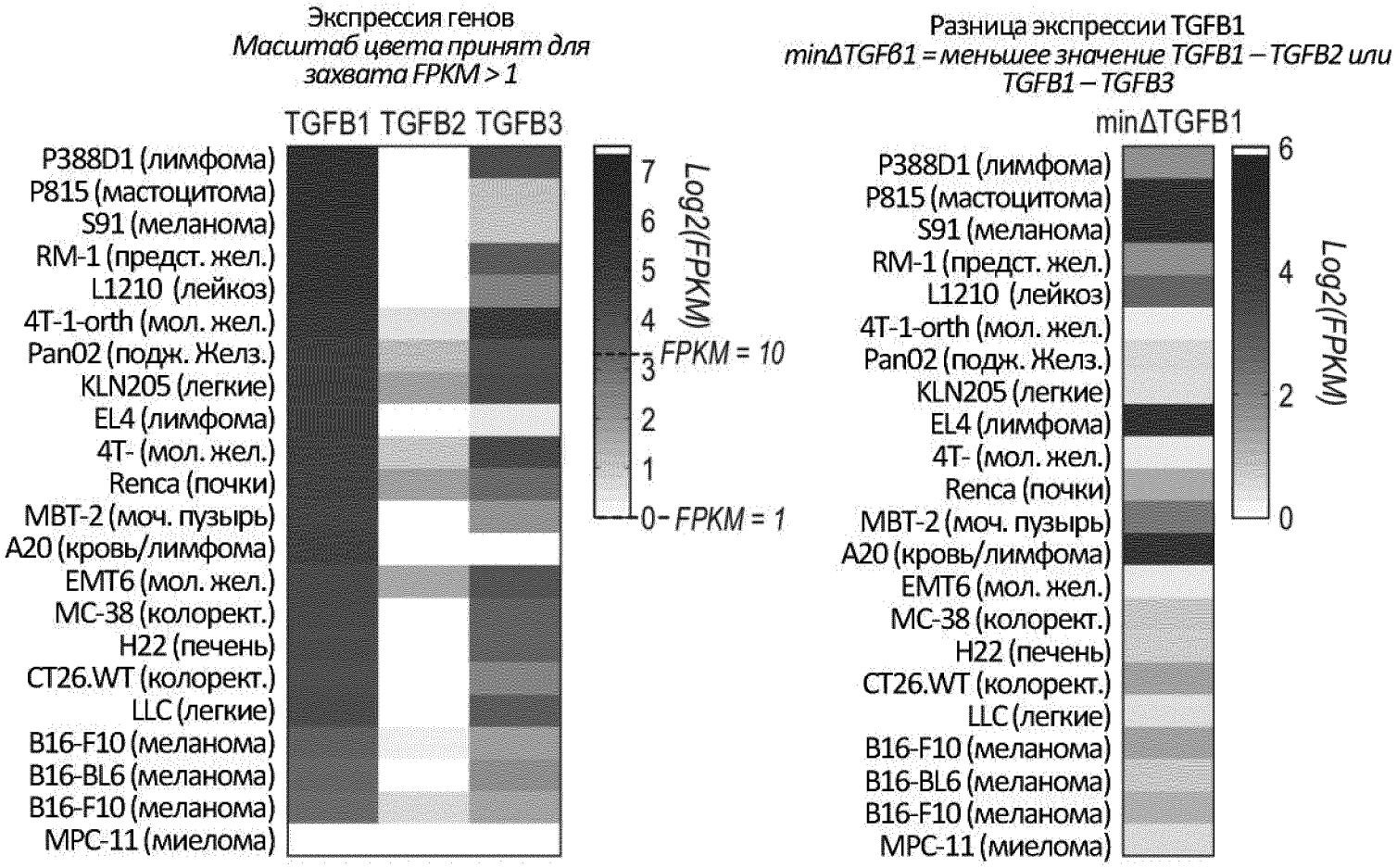

TGFB1
TGFB2
TGFB3
Карцинома уротелия мочевого пузыря
Инвазивная карцинома молочной железы
Рак шейки матки и эндоцервикальный рак
Плоскоклеточная карцинома головы и шеи
Светлоклеточная карцинома почек
Папиллярно-клеточная карцинома почек
Гепатоцеллюларная карцинома печени
Аденокарцинома легких
Меланома кожи
Аденокарцинома желудка
Острый миелоидный лейкоз
Аденокортикальный рак
Низкодифференцированная глиома головного мозга
Холангиокарцинома
Аденокарцинома толстого кишечника
Диффузная крупно-клеточная В-лимфома
Карцинома пищевода
Мультиформная глиобластома
Хромофобный рак почек
Плоскоклеточная карцинома почек
Мезотелиома
Серозная кистаденокарцинома яичников
Аденокарцинома поджелудочной железы
Феохромоцитома и параганглиома
Аденокарцинома предстательный железы
Аденокарцинома прямой кишки
Саркома
Опухоль зародышевых клеток яичек
Тимома
Карционома щитовидной железы
Карциносаркома матки
Эндометриоидная карцинома тела матки
Увеальная меланома
Одобренные виды терапии контрольных точек
Масштаб (% образцов пациентов (+) в отношении изоформы TGFB
100
80
60
40
20
0
Анализ: >10000 образцов, охватывающих 33 типа опухоли (RNAseq Атласа генома рака)
>30 FPKM , принятых за пороговое значение для «экспресируемых» 1(+) для каждой изформы TGFβ в каждом образце
Тепловая карта, созданная для % (+) образцов для каждого типа опухоли

Фиг. 20C

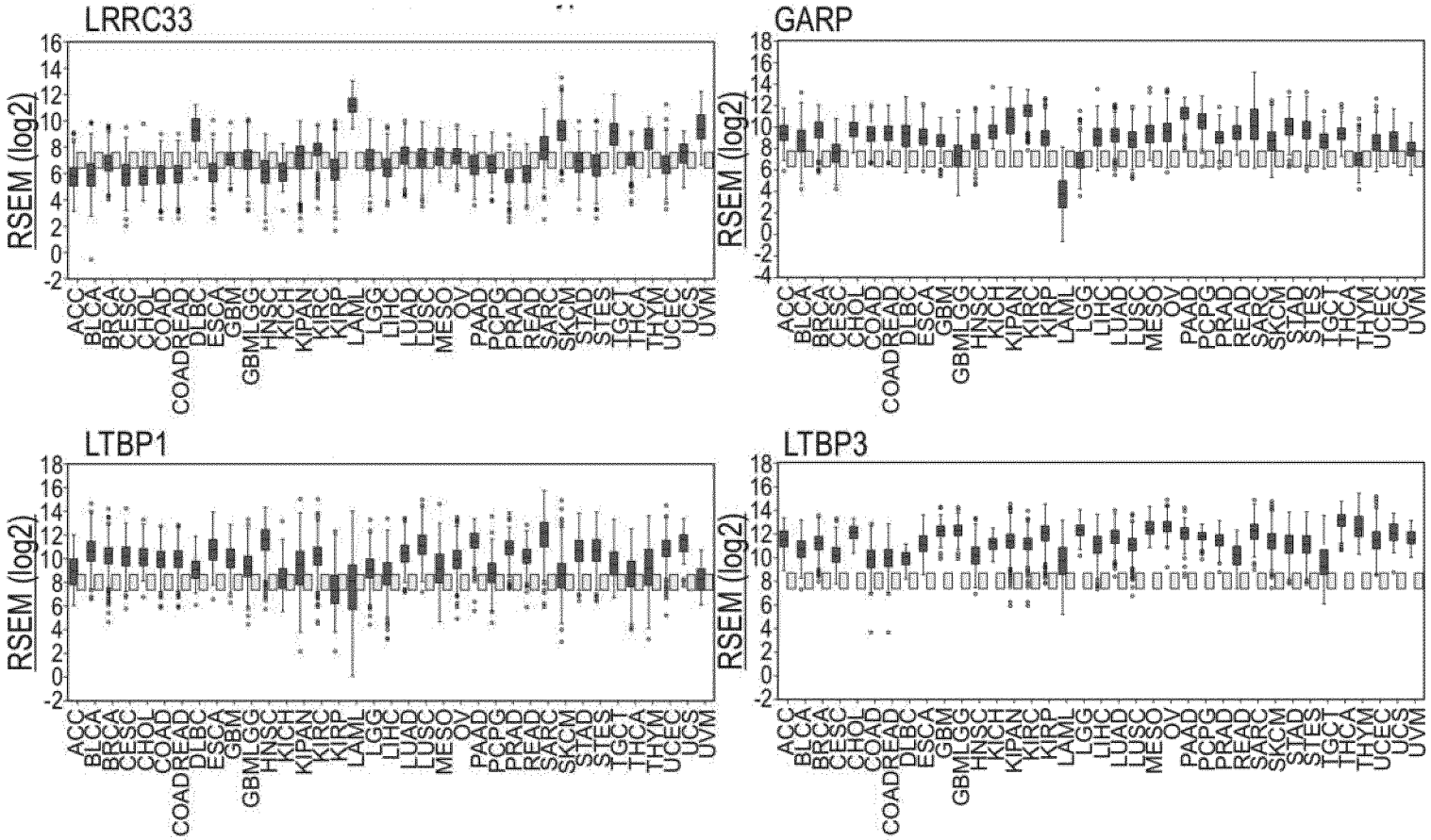


Данные RNAseq образцов пациентов (TCGA); пороговое значение для «положительных» принято на уровне FPKM>30

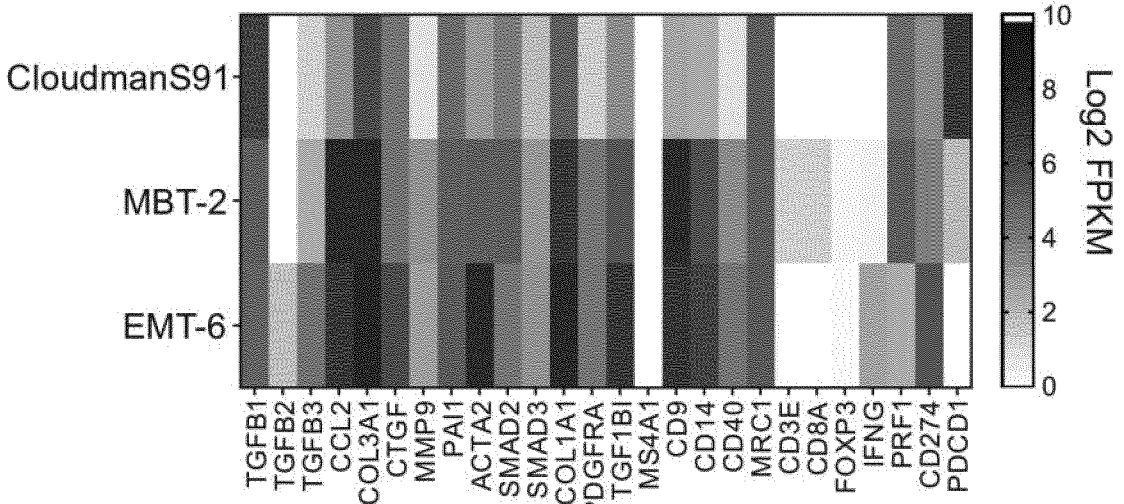
Фиг. 20D


Экспрессия генов
Масштаб цвета принят для захвата FPKM > 1
TGFB1 TGFB2 TGFB3
P388D1 (лимфома)
P815 (мастоцитома)
S91 (меланома)
RM-1 (предст. жел.)
L1210 (лейкоз)
4T-1-orth (мол. жел.)
Pan02 (подж. Желз.)
KLN205 (легкие)
EL4 (лимфома)
4T- (мол. жел.)
Renca (почки)
MBT-2 (моч. пузырь)
A20 (кровь/лимфома)
EMT6 (мол. жел.)
MC-38 (колоректт.)
H22 (печень)
CT26.WT (колоректт.)
LLC (легкие)
B16-F10 (меланома)
B16-BL6 (меланома)
B16-F10 (меланома)
MPC-11 (миелома)
7
6
5
4
3
2
1
0
Log2(FPKM)
FPKM = 10
FPKM = 1
Разница экспрессии TGFB1
minΔTGFB1 = меньшее значение TGFB1 – TGFB2 или TGFB1 – TGFB3
minΔTGFB1
P388D1 (лимфома)
P815 (мастоцитома)
S91 (меланома)
RM-1 (предст. жел.)
L1210 (лейкоз)
4T-1-orth (мол. жел.)
Pan02 (подж. Желз.)
KLN205 (легкие)
EL4 (лимфома)
4T- (мол. жел.)
Renca (почки)
MBT-2 (моч. пузырь)
A20 (кровь/лимфома)
EMT6 (мол. жел.)
MC-38 (колоректт.)
H22 (печень)
CT26.WT (колоректт.)
LLC (легкие)
B16-F10 (меланома)
B16-BL6 (меланома)
B16-F10 (меланома)
MPC-11 (миелома)
6
4
2
0
Log2(FPKM)

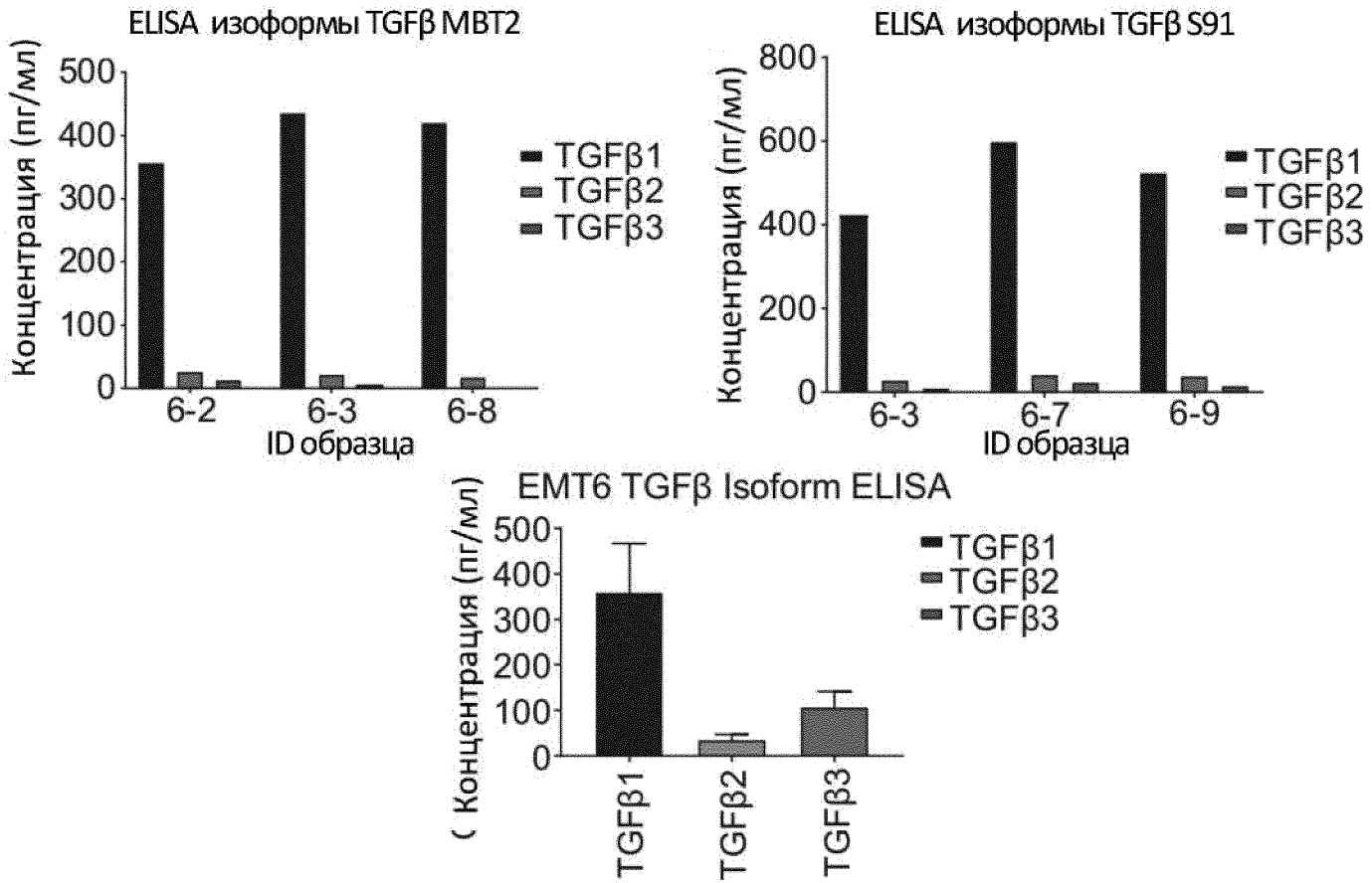
Фиг. 20E


LRRC33
GARP
LTBP1
LTBP3
RSEM (log2)
ACC
BLCA
BRCA
CESC
CHOL
COAD
READ
DLBC
ESCA
GBM
GBMLGG
HNSC
KICH
KIPAN
KIRC
KIRP
LAML
LGG
LIHC
LUAD
LUSC
MESO
OV
PAAD
PCPG
PRAD
READ
SARC
SKCM
STAD
STES
TGCT
THCA
THYM
UCEC
UCS
UVM

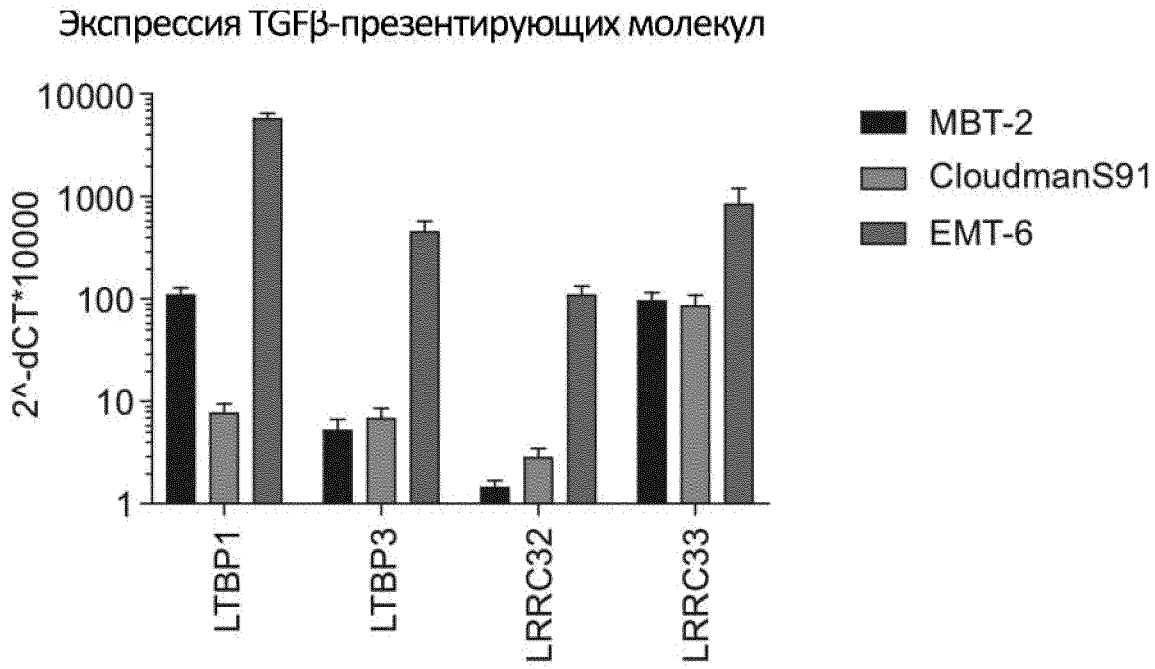
Фиг. 20F


CloudmanS91
MBT-2
EMT-6
TGFB1
TGFB2
TGFB3
CCL2
COL3A1
CTGF
MMP9
PAI1
ACTA2
SMAD2
SMAD3
COL1A1
PDGFRA
TGF1BI
MS4A1
CD9
CD14
CD40
MRC1
CD3E
CD8A
FOXP3
IFNG
PRF1
CD274
PDCD1
10
8
6
4
2
0
Log2 FPKM

Фиг. 20G

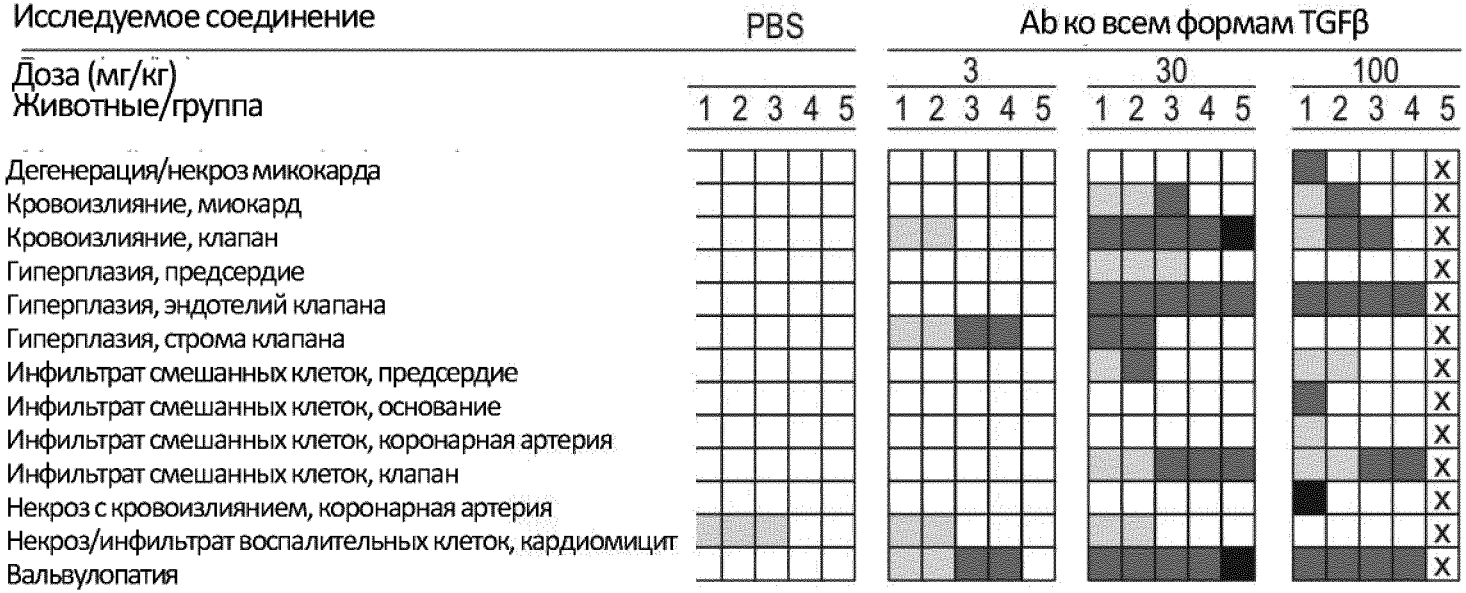

ELISA изоформы TGFβ MBT2
Концентрация (пг/мл)
500
400
300
200
100
0
6-2
6-3
6-8
ID образца
TGFβ1
TGFβ2
TGFβ3
ELISA изоформы TGFβ S91
Концентрация (пг/мл)
800
600
400
200
0
6-3
6-7
6-9
ID образца
TGFβ1
TGFβ2
TGFβ3
EMT6 TGFβ Isoform ELISA
(Концентрация (пг/мл)
500
400
300
200
100
0
TGFβ1
TGFβ2
TGFβ3
TGFβ1
TGFβ2
TGFβ3

Фиг. 20H


Экспрессия TGFβ-презентирующих молекул
2^-dCT*10000
10000
1000
100
10
1
LTBP1
LTBP3
LRRC32
LRRC33
MBT-2
CloudmanS91
EMT-6

Фиг. 21A

Образец сердца, результаты микроскопического исследования



Ab ко всем формам TGFβ вводили еженедельно в течение 1 недели

Фиг. 21B



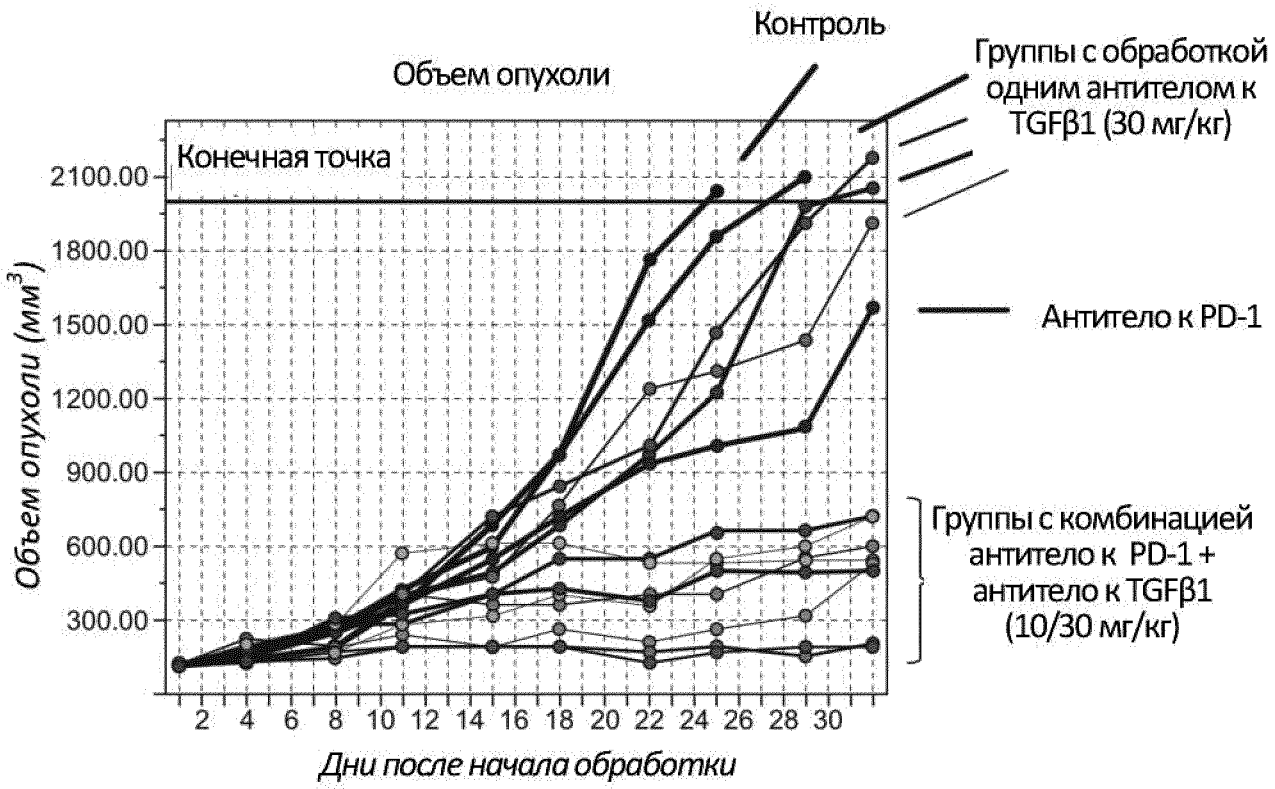
SR-AB3 вводили еженедельно в течение 4 недель
Ингибитор ALK5 вводили ежедневно в течение 5 дней
Ab ко всем формам TGFβ вводили еженедельно в течение 1 недели

Фиг. 21C

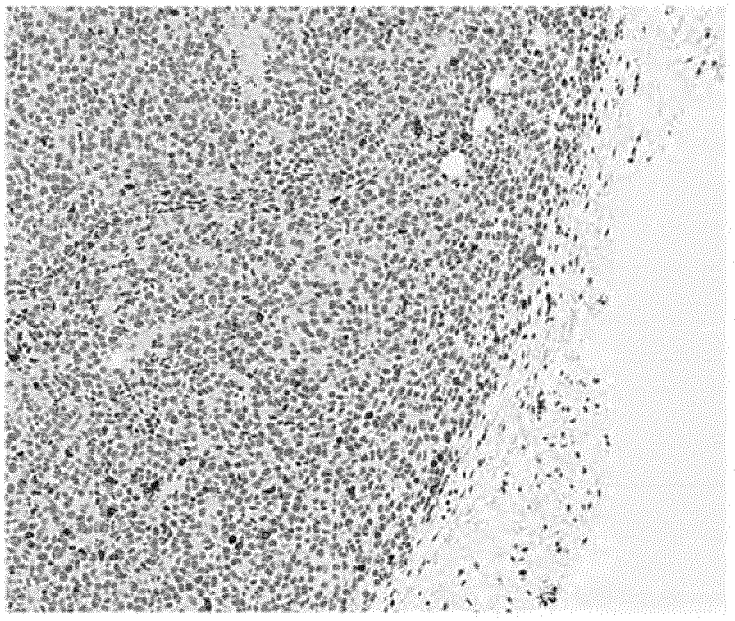


SR-AB6 вводили еженедельно в течение 4 недель
Ингибитор ALK5 вводили ежедневно в течение 7 дней
Ab ко всем формам TGFβ вводили еженедельно в течение 1 недели
Сывороточная концентрация Ab6 достигала 2300 мкг/мл в дозе 100 мг/кг через 4 недели

Фиг. 22

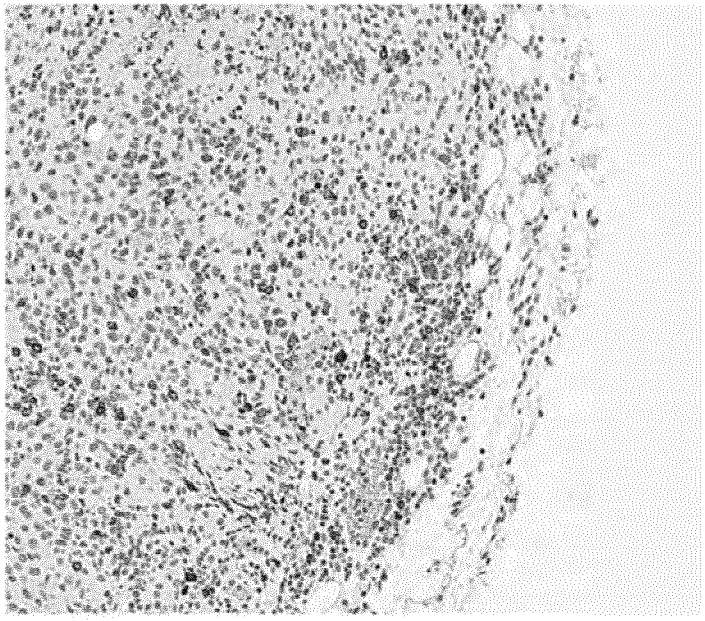

Объем опухоли
Контроль
Группы с обработкой одним антителом к TGFβ1 (30 мг/кг)
Конечная точка
Антитело к PD-1
Группы с комбинацией антитело к PD-1 + антитело к TGFβ1 (10/30 мг/кг)
Объем опухоли (мм3)
2100.00
1800.00
1500.00
1200.00
900.00
600.00
300.00
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
Дни после начала обработки

Фиг. 23A



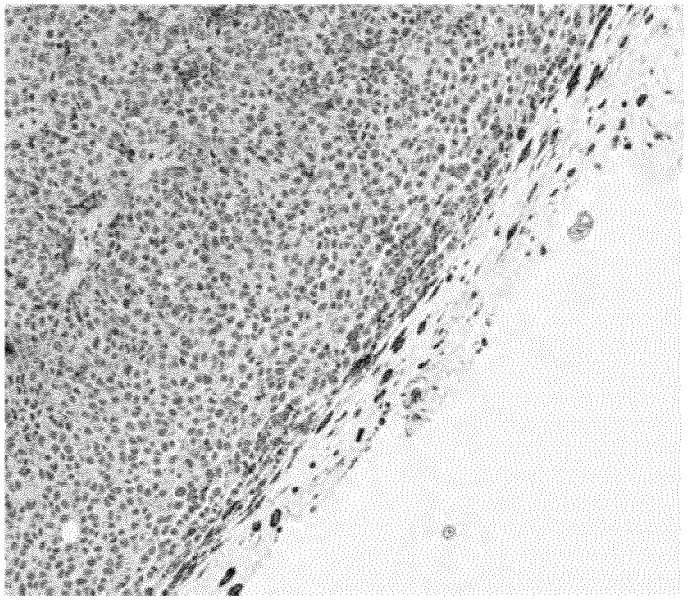
Обработано антителом к PD-1;
Окрашено CD8+ маркером (CD8a)

Фиг. 23B



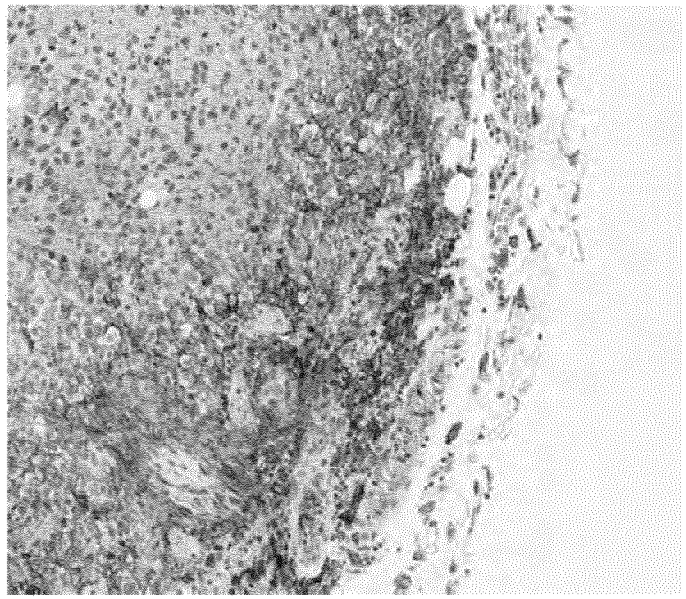
Обработано антителом к PD-1 + контекстно-независимым ингибитором TGFβ1;
Окрашено CD8+ маркером (CD8a)

Фиг. 24A



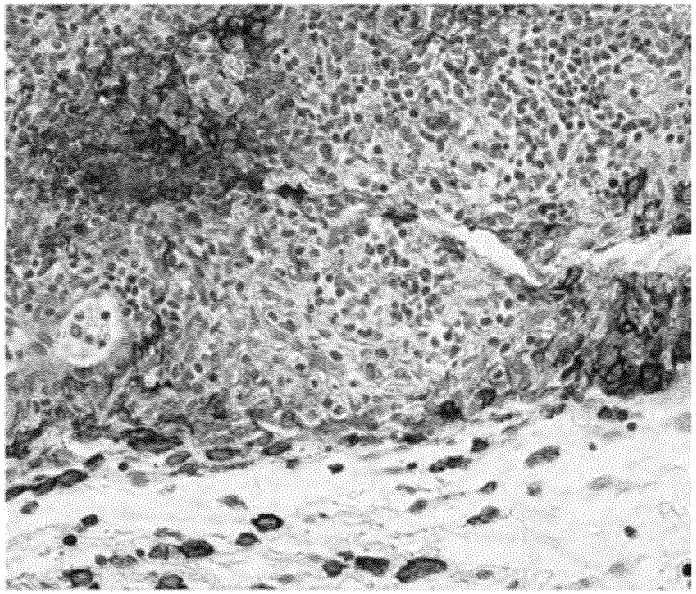
Обработано антителом к PD-1;
Окрашено маркером макрофагов (F4/80)

Фиг. 24B



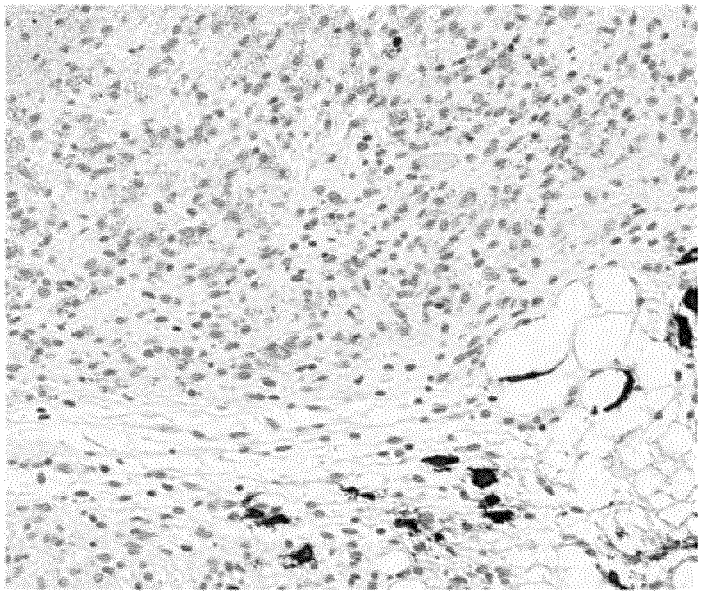
Обработано антителом к PD-1 + контекстно-независимым ингибитором TGFβ1;
Окрашено маркером макрофагов (F4/80)

Фиг. 24C



F4/80

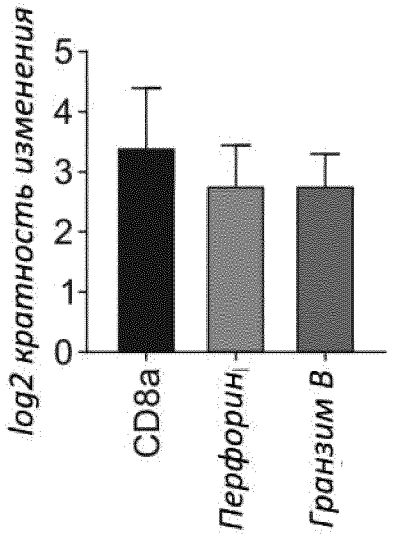
Фиг. 24D



CD163

Антитело к PD-1 + контекстно-независимый ингибитор TGFβ1 30 мг/кг

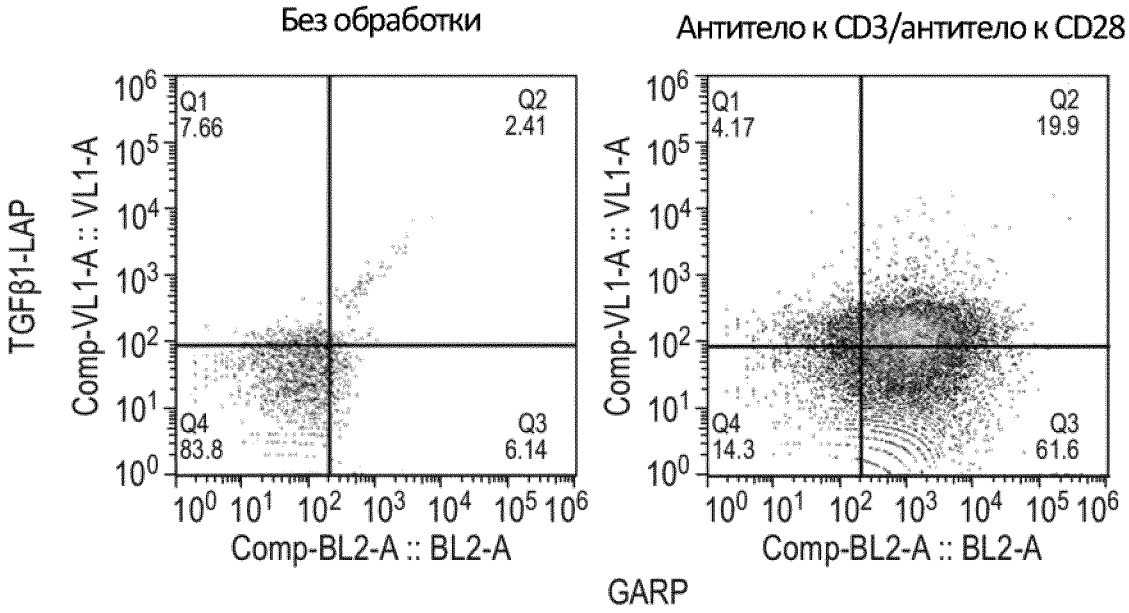
Фиг. 25



Антитело к PD-1/SR-AB3 по отношению к антителу к PD-1

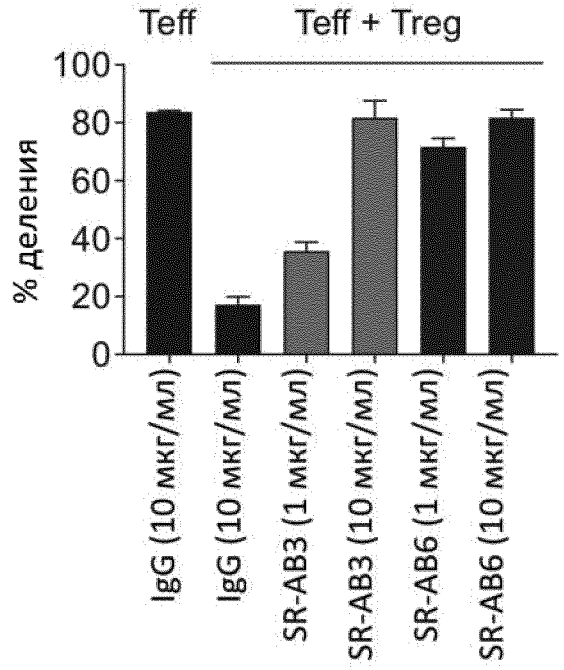
N = 10 животных/группа

Фиг. 26A



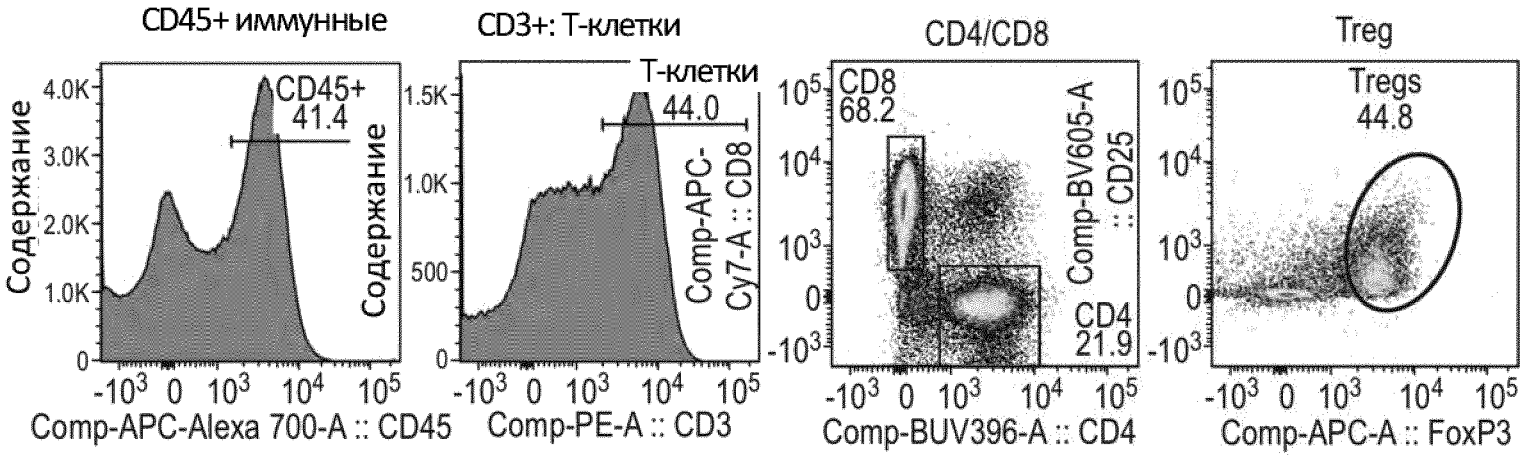
Отсортированные человеческие nTreg повышали экспрессию Garp-proTGFβ1 после стимуляции CD3/CD28

Фиг. 26B


Teff
Teff + Treg
100
80
60
40
20
0
% деления
IgG (10 мкг/мл)
IgG (10 мкг/мл)
SR-AB3 (1 мкг/мл)
SR-AB3 (10 мкг/мл)
SR-AB6 (1 мкг/мл)
SR-AB6 (10 мкг/мл)

Фиг. 27A

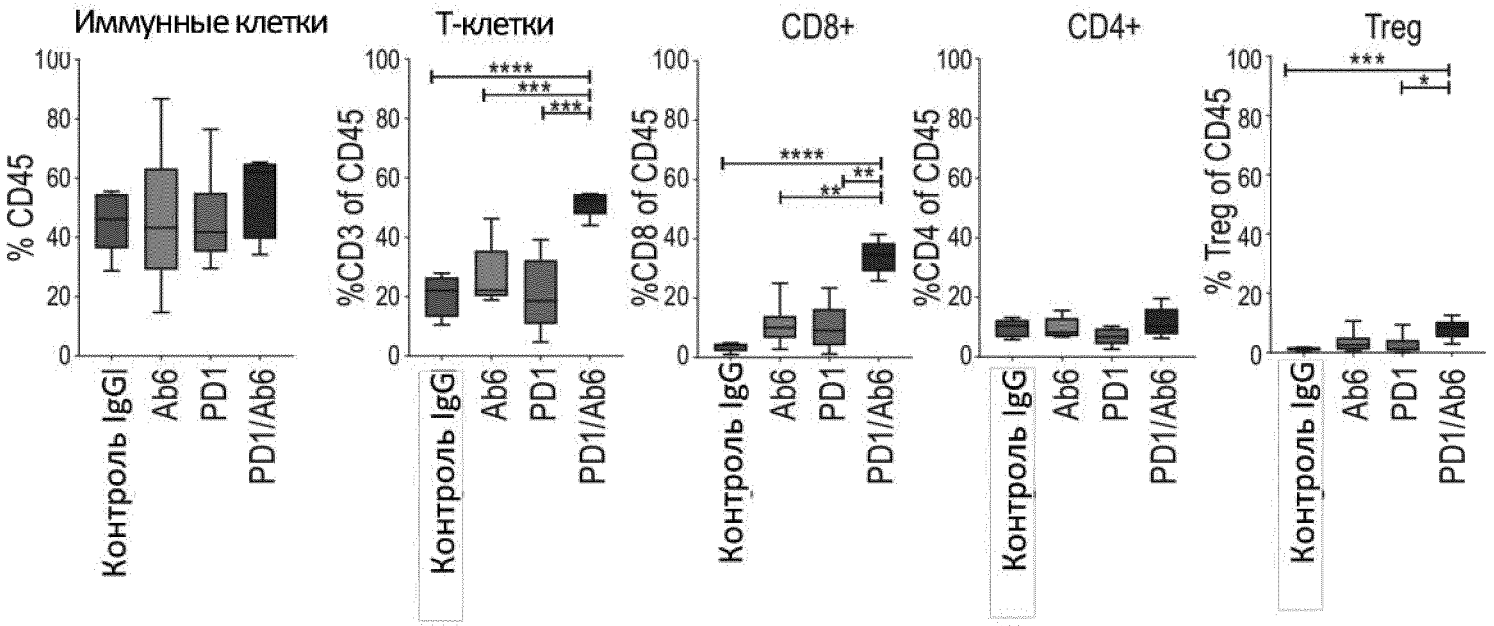
Клетки → дублетное разделение→живые клетки



Противоопухолевые CD8+: цитотоксические Т-клетки (CTL): CD3+CD8+
Хелперные CD4+: CD3+CD4+
Регуляторные Т-клетки: CD3+CD4+Foxp3+

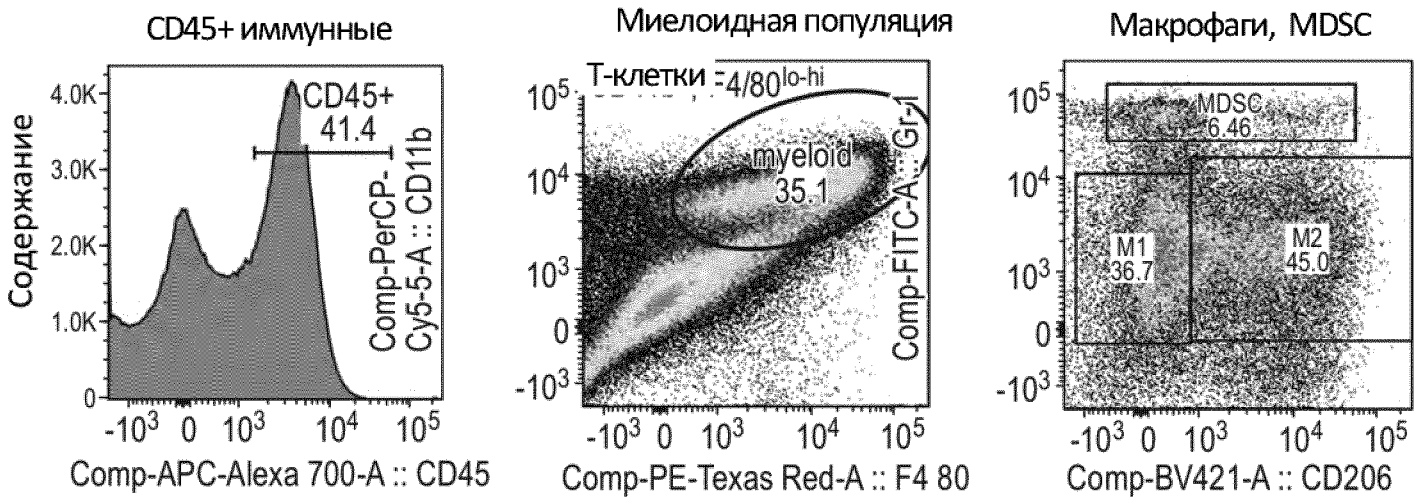
Все гейты пропускали контроли FMO

Фиг. 27B


Иммунные клетки
% CD45
Т-клетки
%CD3 of CD45
CD8+
%CD8 of CD45
CD4+
%CD4 of CD45
Treg
% Treg of CD45
0
20
40
60
80
100
****
***
**
*
Контроль IgG
Ab6
PD1
PD1/Ab6

Фиг. 28А

Клетки → дублетное разделение→живые клетки



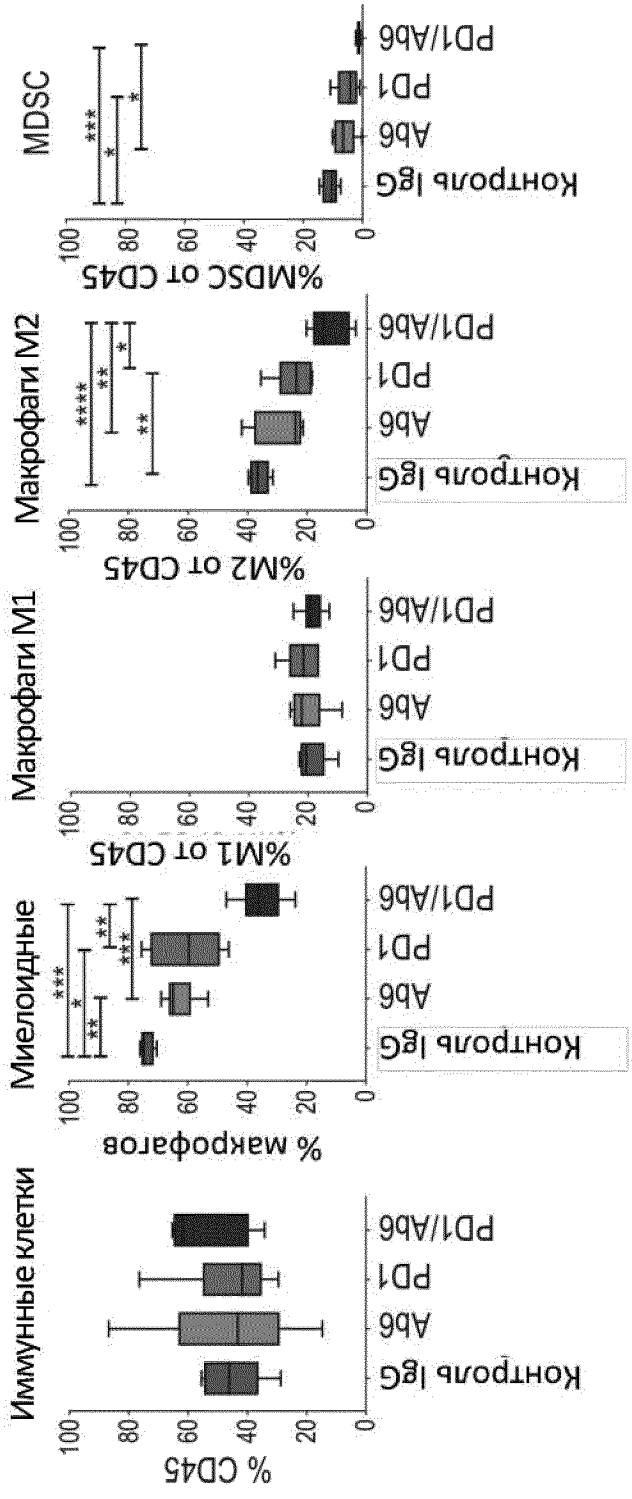
M1 (противоопух.) Мф: CD11b+F4/80+/CD206-

M2 (проопух.) Мф: CD11b+F4/80+/CD206+

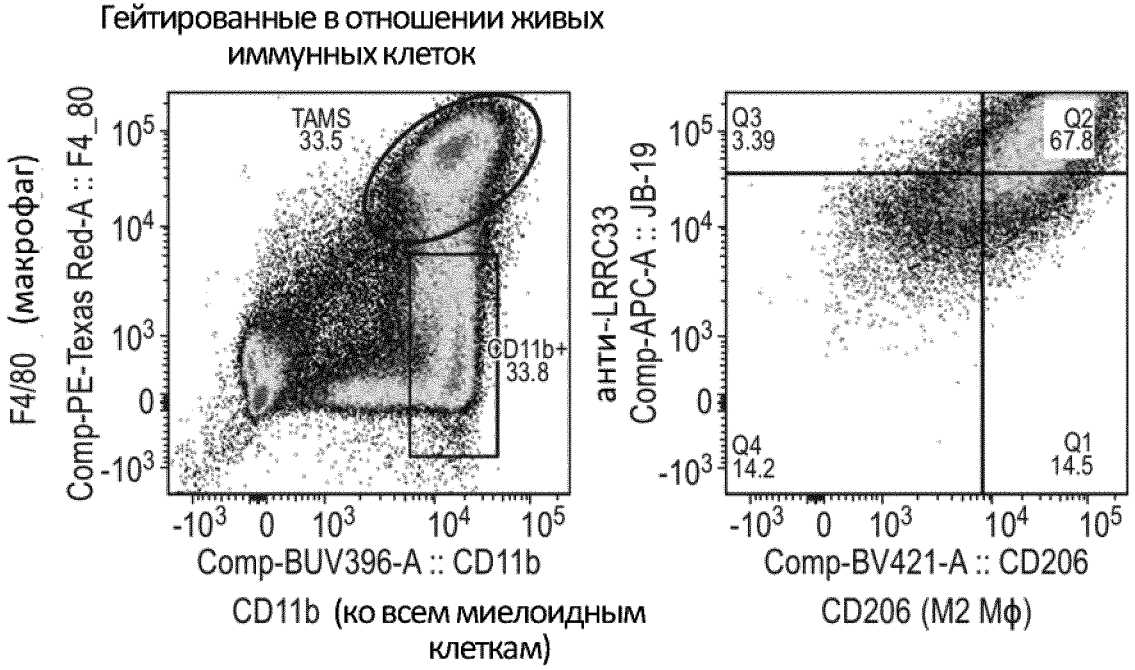
MDSC: CD11b+F4/80-/GR-1+

Все гейты пропускали контроли FMO

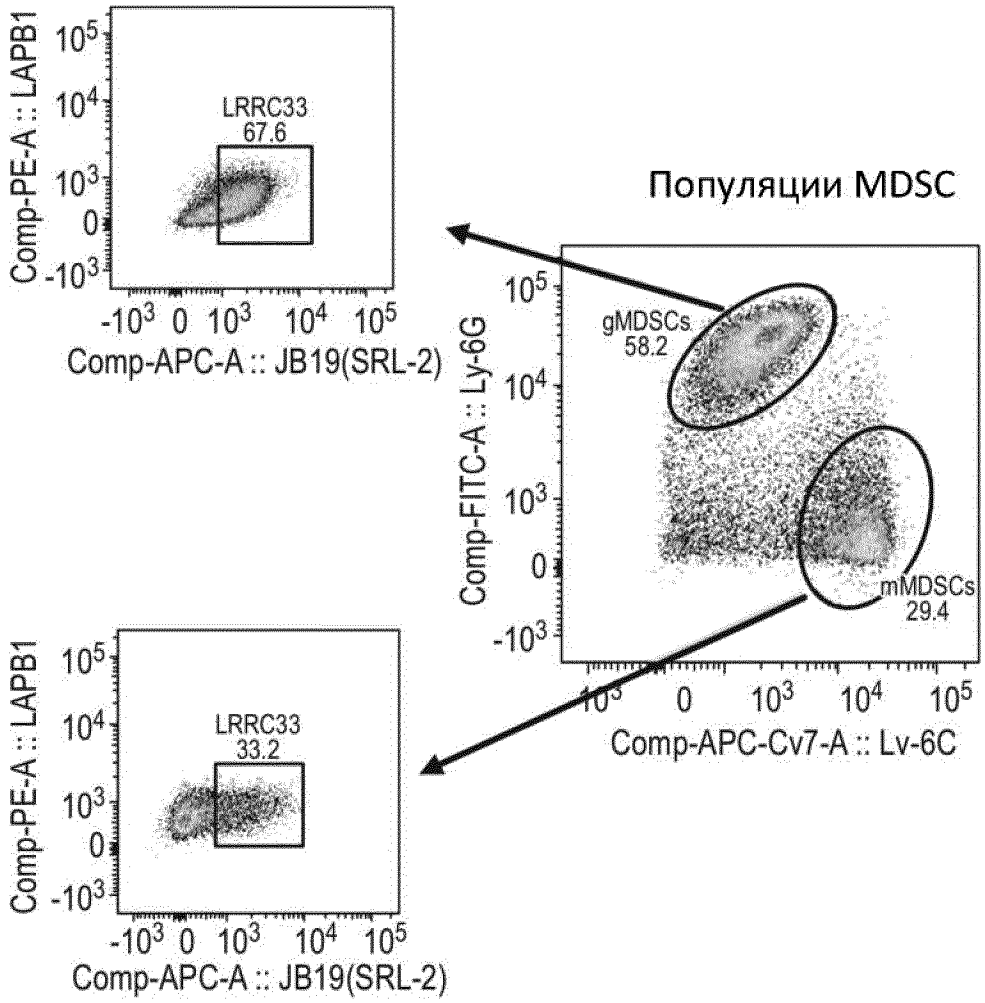
Фиг. 28B


Иммунные клетки
% CD45
Миелоидные
% макрофагов
Макрофаги M1
%M1 от CD45
Макрофаги M2
%M2 от CD45
MDSC
%MDSC от CD45
Контроль IgG
Аb6
PD1
PD1/Ab6

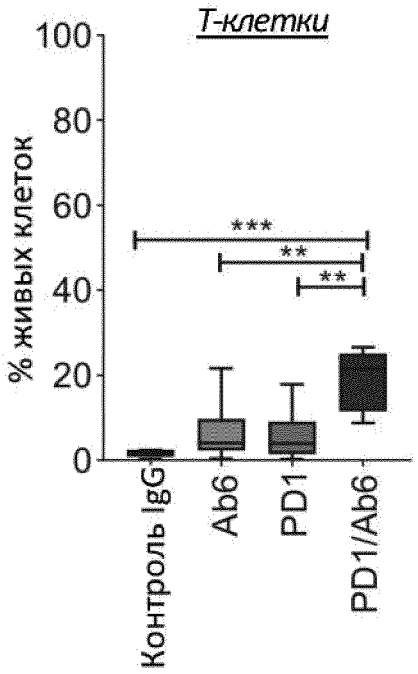
Фиг. 28C


Гейтированные в отношении живых иммунных клеток
TAMS
33.5
CD11b+
33.8
F4/80 (макрофаг)
Comp-PE-Texas Red-A :: F4_80
Comp-BUV396-A :: CD11b
CD11b (ко всем миелоидным клеткам)
Q3
3.39
Q2
67.8
Q4
14.2
Q1
14.5
анти-LRRC33
Comp-APC-A :: JB-19
Comp-BV421-A :: CD206
CD206 (M2 Mϕ)

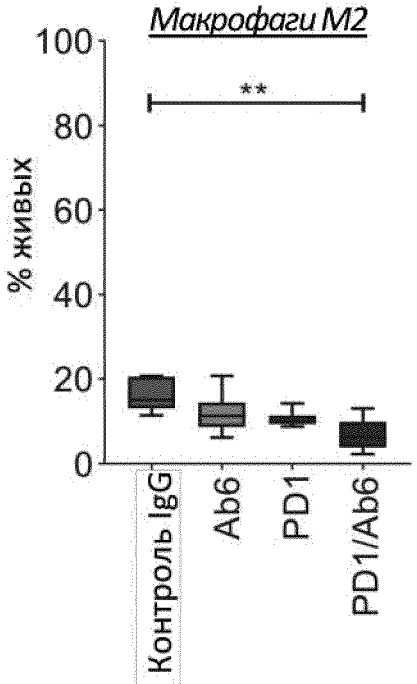
Фиг. 28D


Популяции MDSC
LRRC33
67.6
Comp-PE-A :: LAPB1
Comp-APC-A :: JB19(SRL-2)
gMDSCs
58.2
mMDSCs
29.4
Comp-FITC-A :: Ly-6G
Comp-APC-Cv7-A :: Lv-6C
LRRC33
33.2
Comp-PE-A :: LAPB1
Comp-APC-A :: JB19(SRL-2)

Фиг. 29A и B

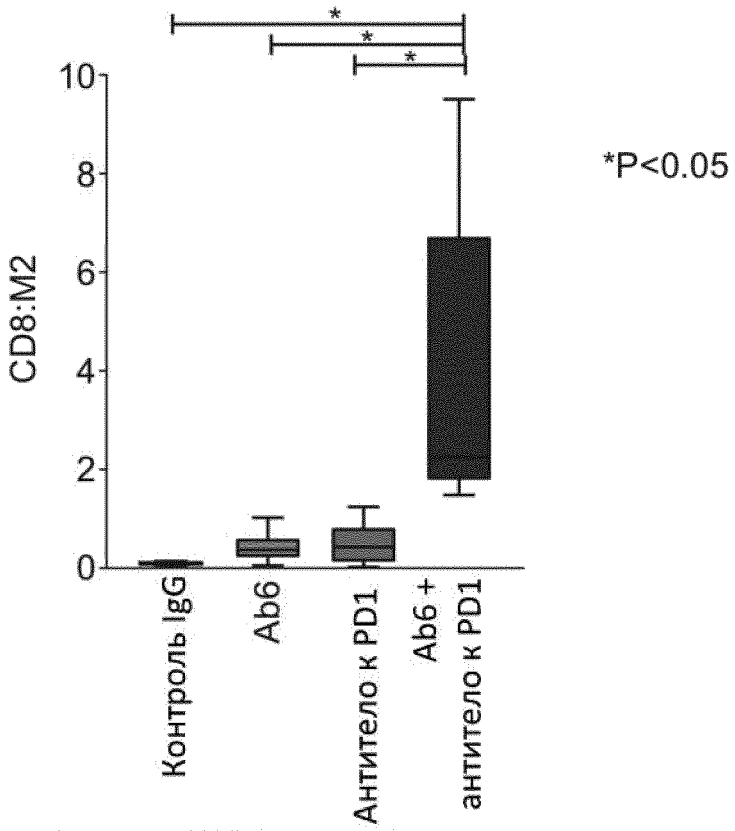


Фиг. 29A



Фиг. 29B

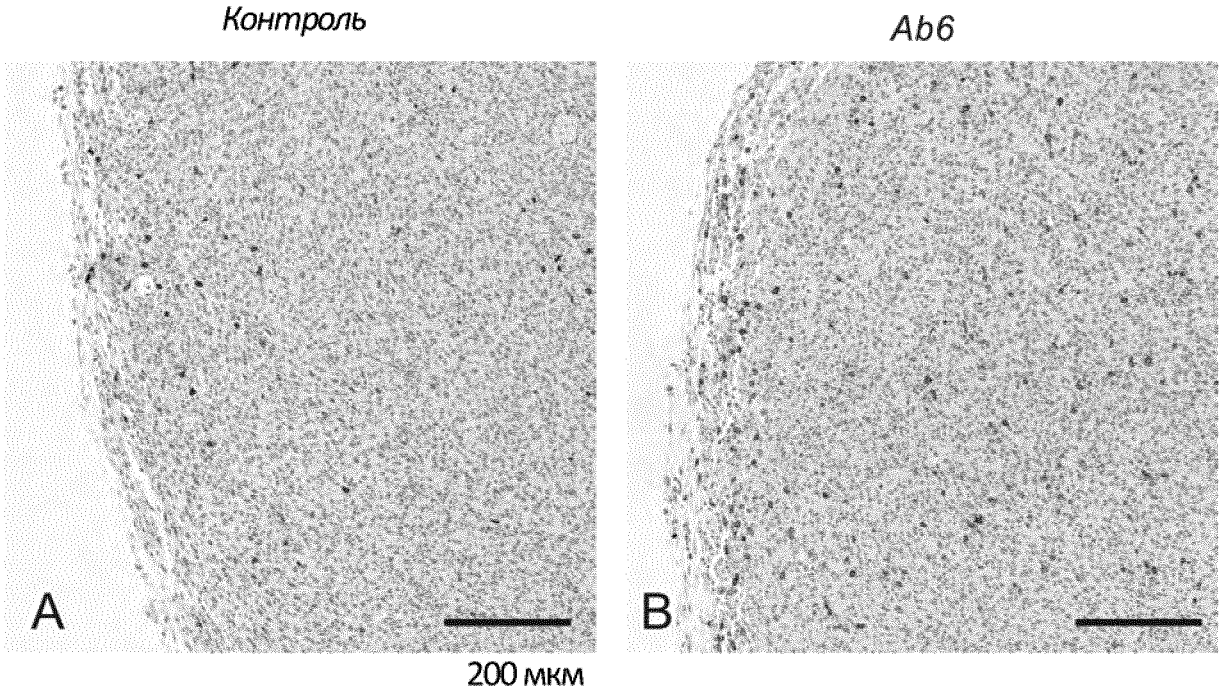
Фиг. 29C



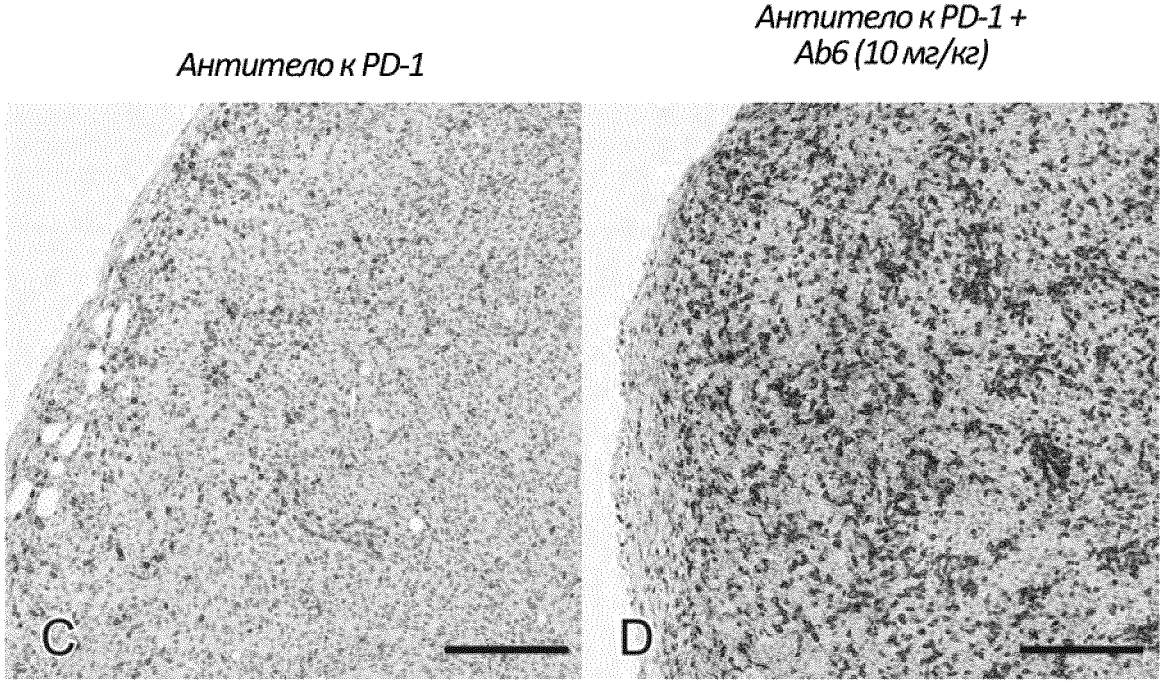
*P<0.05

Проточно-цитометрический анализ MBT-2 опухолей на 10-1 день после начала обработки

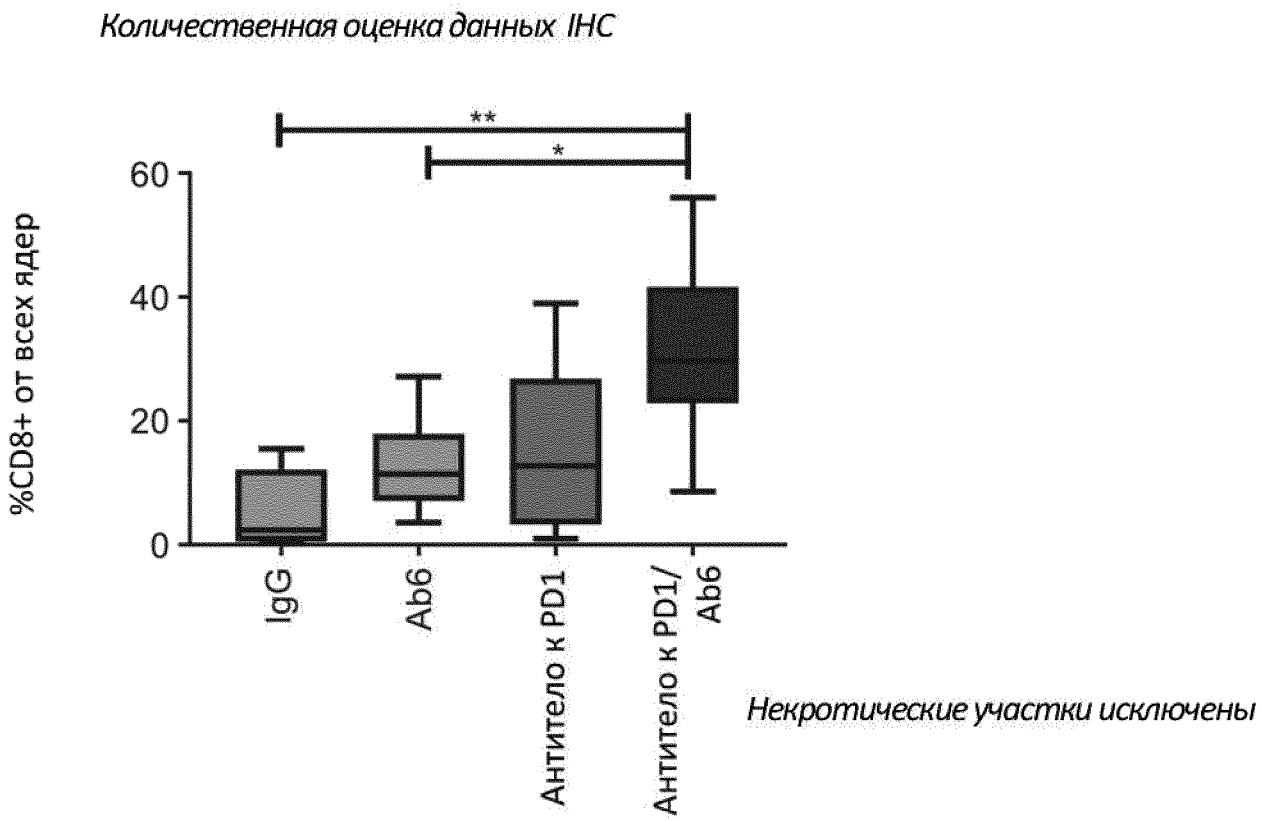
Фиг. 30A и B



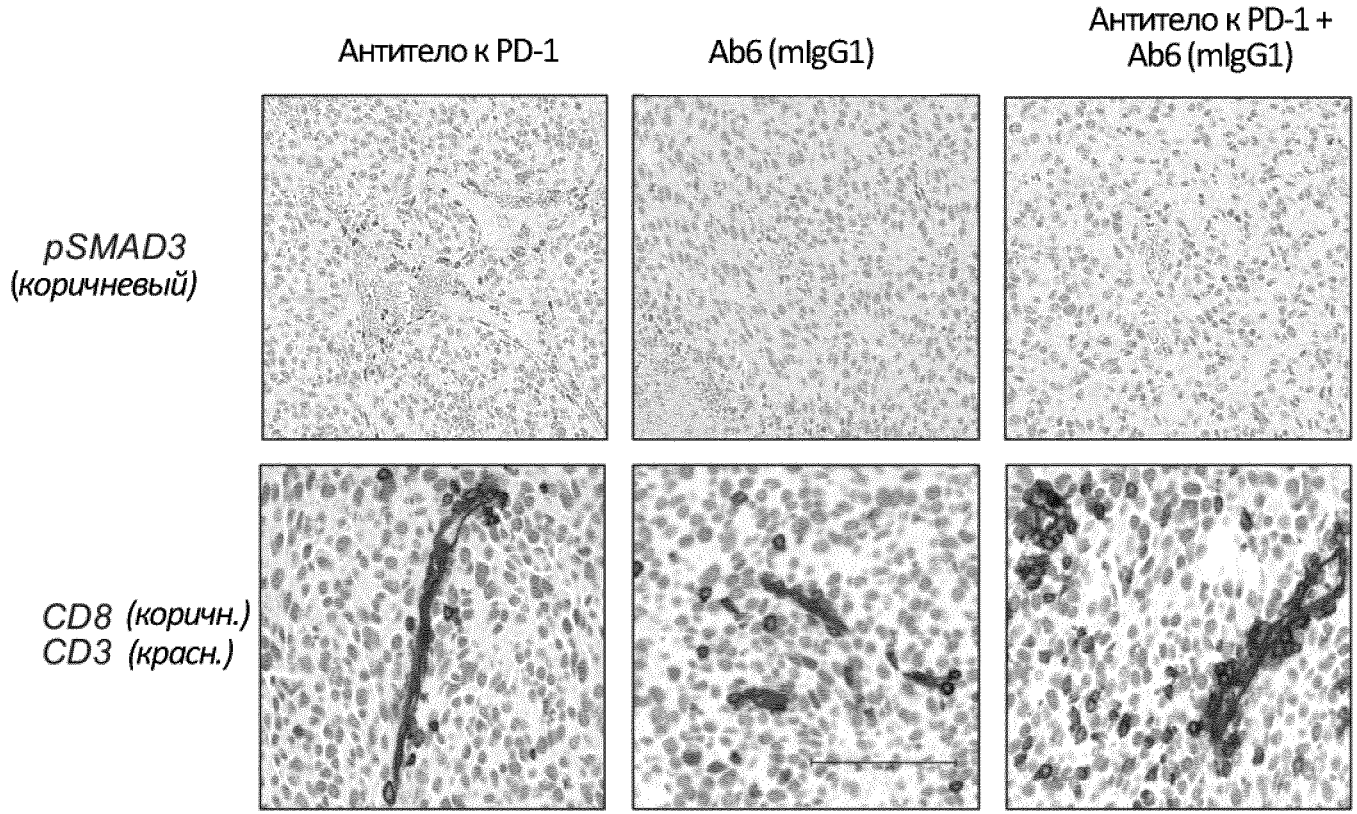
Фиг. 30C и D



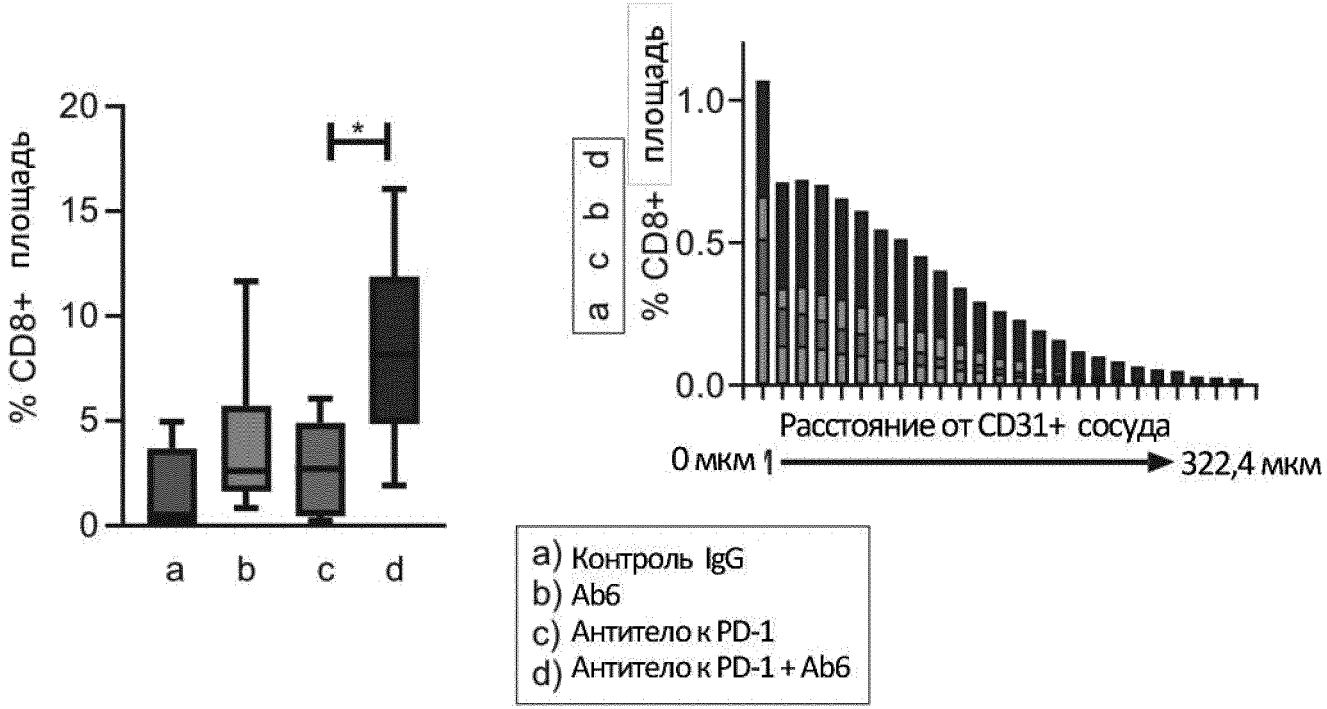
Фиг. 30E


Количественная оценка данных IHC
%CD8+ от всех ядер
60
40
20
0
**
*
IgG
Ab6
Антитело к PD1
Антитело к PD1/ Ab6
Некротические участки исключены

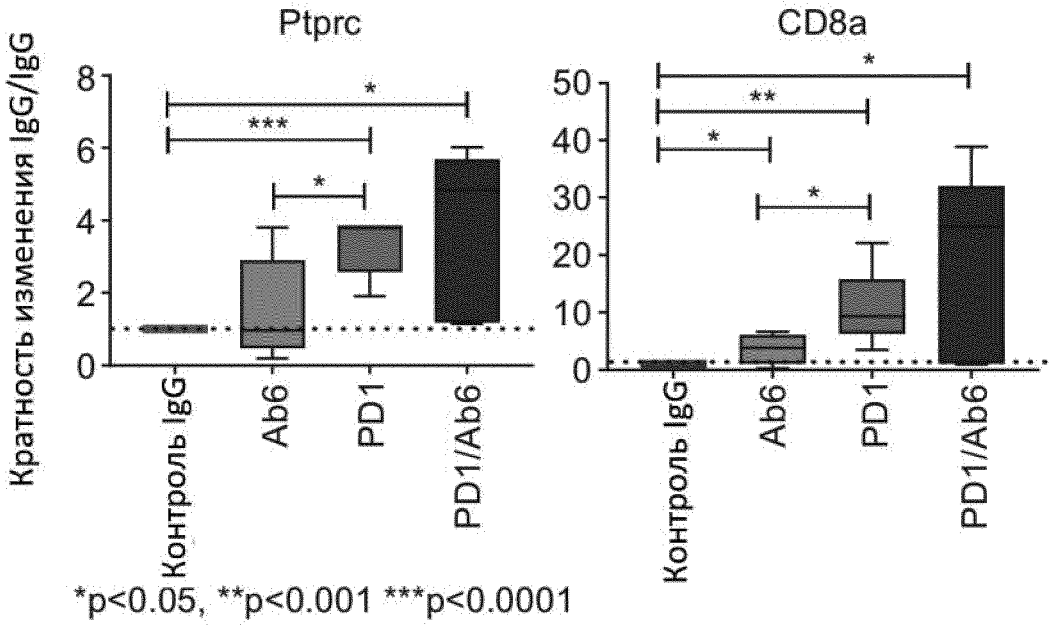
Фиг. 30F


Антитело к PD-1
Ab6 (mIgG1)
Антитело к PD-1 +
Ab6 (mIgG1)
pSMAD3
(коричневый)
CD8 (коричн.)
CD3 (красн.)

Фиг. 30G


% CD8+ площадь
20
15
10
5
0
*
a
b
c
d
a c b d
% CD8+ площадь
1.0
0.5
0.0
Расстояние от CD31+ сосуда
0 мкм
322,4 мкм
a) Контроль IgG
b) Ab6
c) Антитело к PD-1
d) Антитело к PD-1 + Ab6

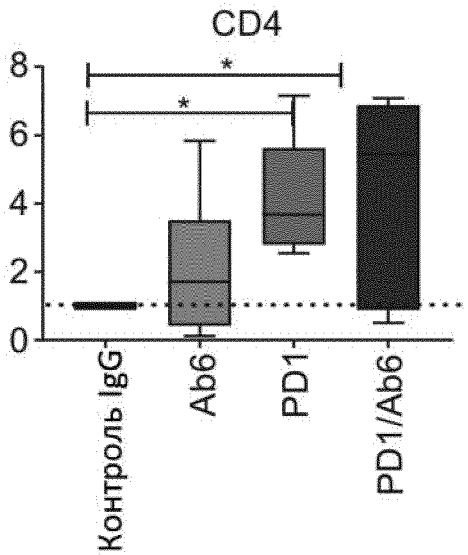
Фиг. 31A и B



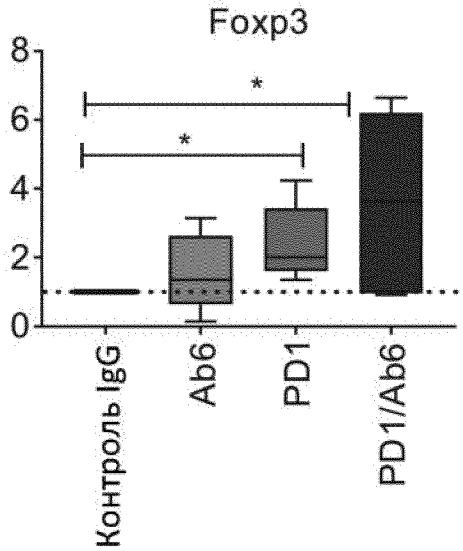
Фиг. 31A

Фиг. 31B

Фиг. 31C и D

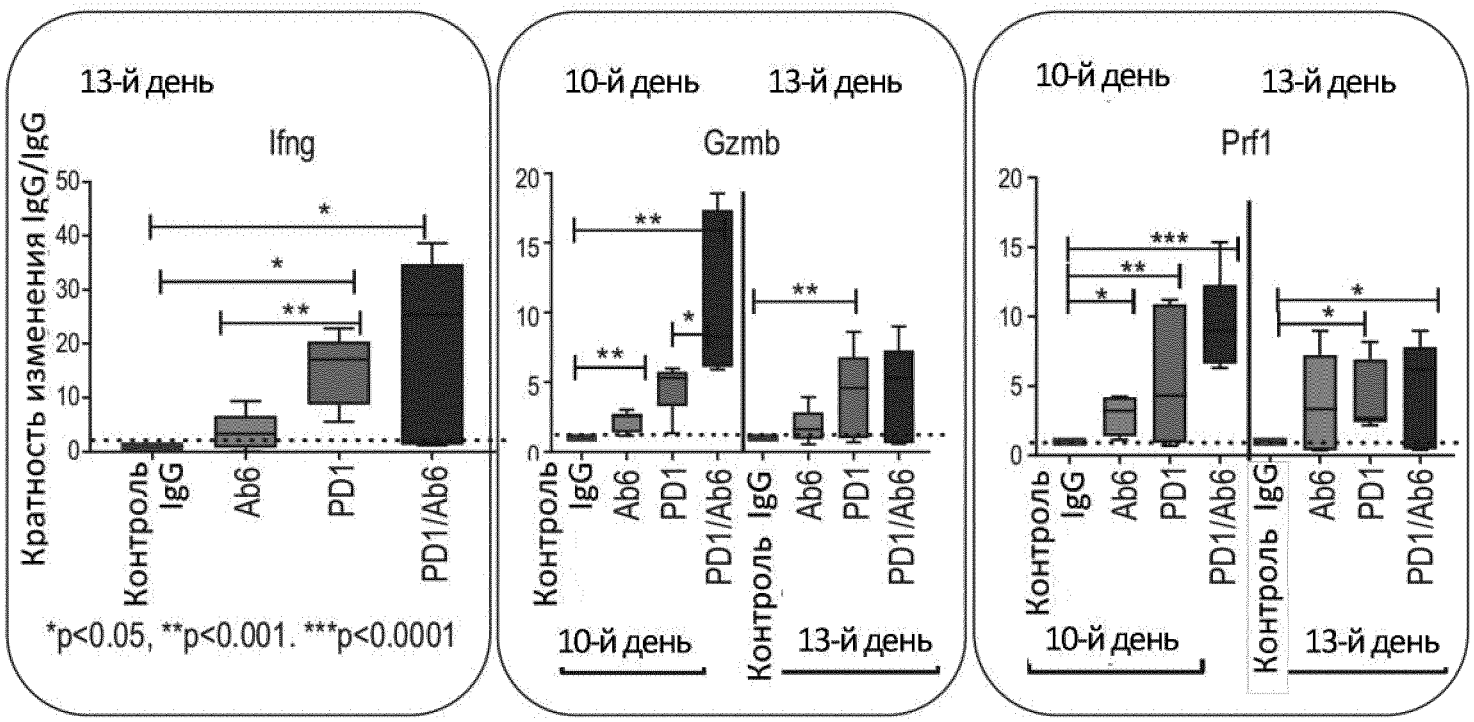


Фиг. 31C



Фиг. 31D

Фиг. 32A, B и C

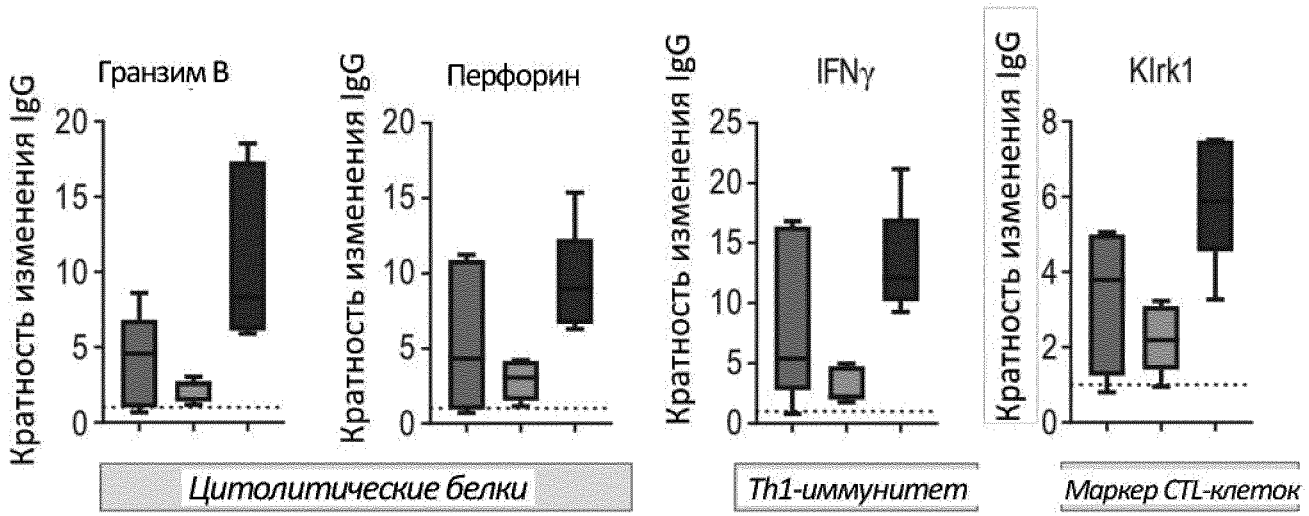


Фиг. 32A

Фиг. 32B

Фиг. 32C

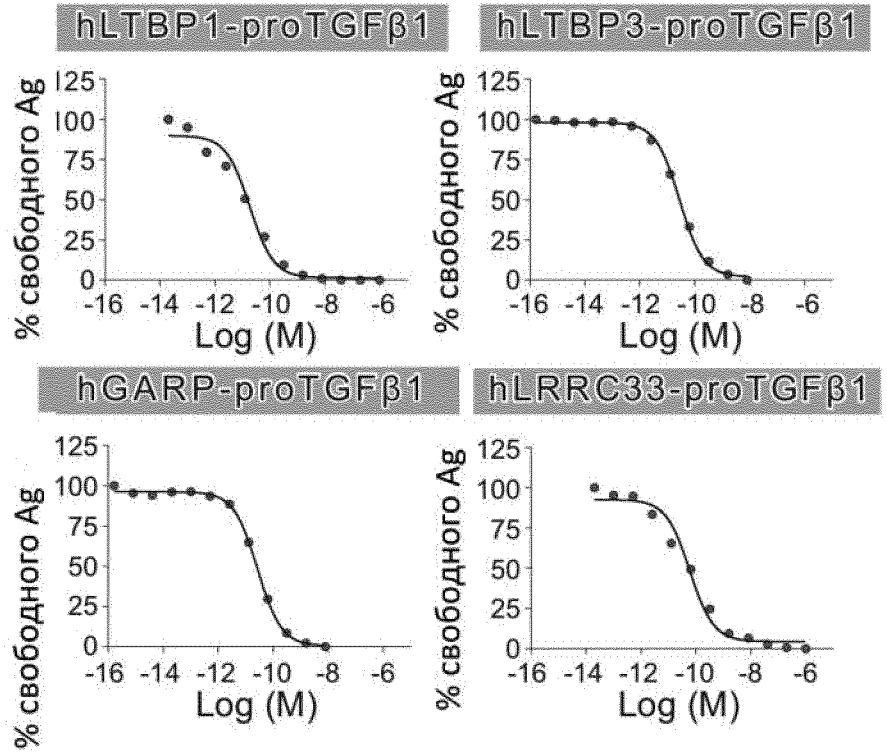
Фиг. 32D



- Левые столбцы (красные) каждой панели: только антитело к PD-1
- Центральные столбцы (оранжевые) каждой панели: только Ab6 mIgG1
- Правые столбцы (синие) каждой панели: антитело к PD-1 + Ab6 mIgG1

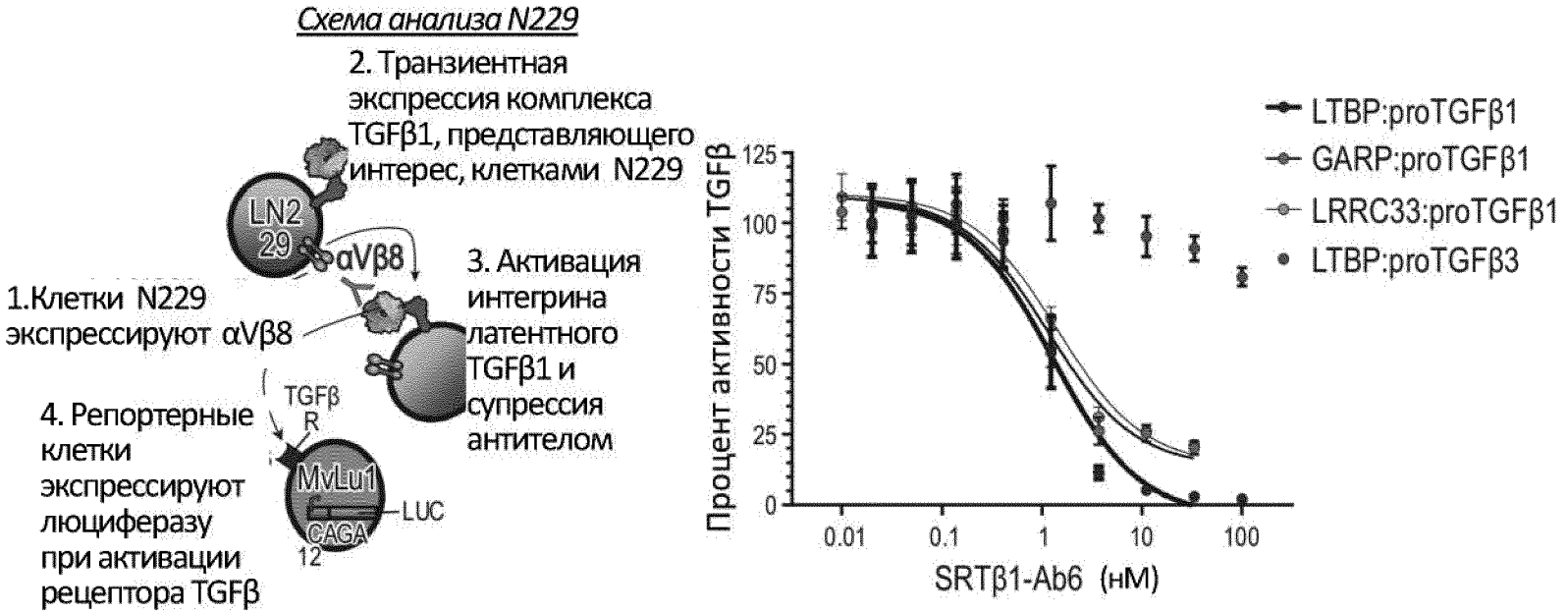
Схема исследования: клетки MBT-2, имплантируемые подкожно. Обработку начинали, когда опухоли в среднем достигали 40-80 мм^3. Антитело к PD-1 (RMP-1-14), вводимое в дозе 10 мг/кг 2× в неделю; Ab6, вводимое 1× в неделю в дозе 10 мг/кг.

Фиг. 33A



Антигенный комплекс	K_D Ab6 (пМ)
hLTBP1-proTGFβ1	18
hLTBP3-proTGFβ1	29
hGARP-proTGFβ1	27
hLRRC33-proTGFβ1	63

Фиг. 33B



Ab6 ингибирует активность всех больших комплексов латентных TGFβ1, но не латентного TGFβ3

Фиг. 34А

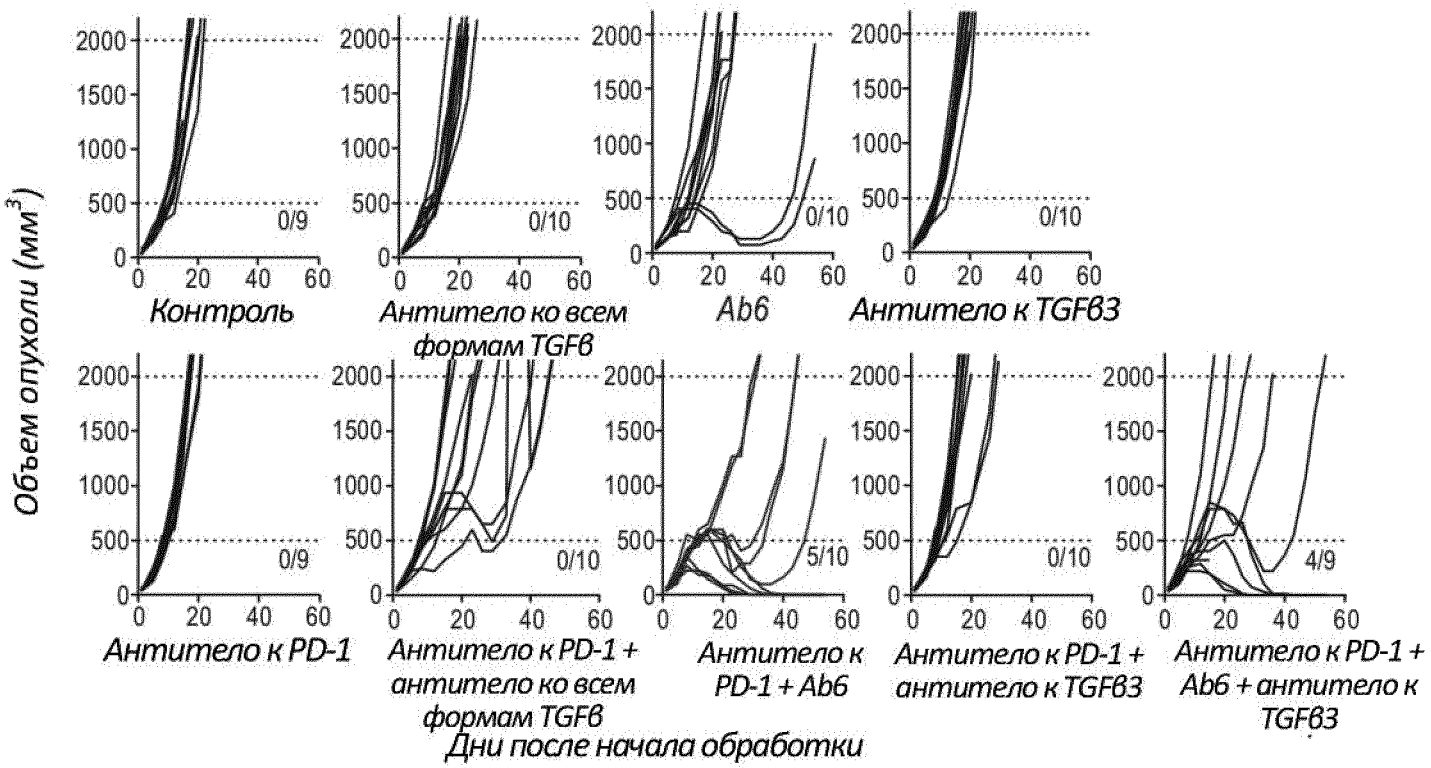
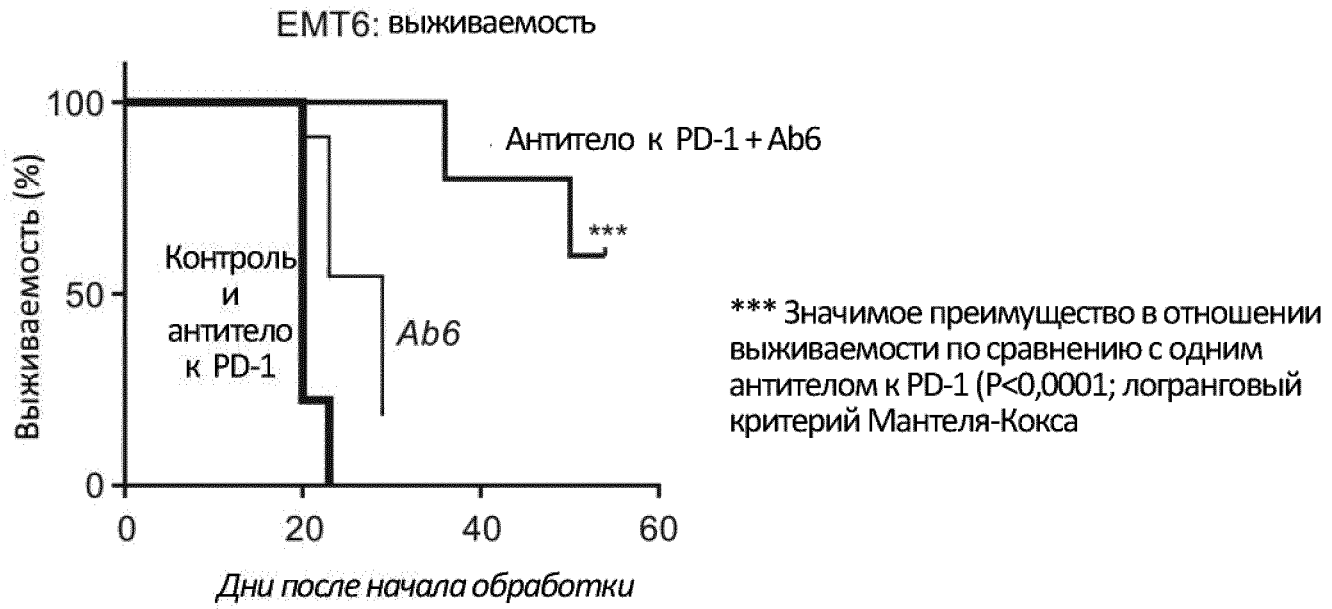


Схема исследования: клетки EMT6, имплантируемые подкожно. Обработку начинали, когда опухоли в среднем достигали 30-60 мм^3. Антитело к PD-1, вводимое в дозе 5 мг/кг 2× в неделю; антитело к TGFβ3, вводимое в дозе 30 мг/кг 1× в неделю; Ab6 (mIgG1), вводимое в дозе 10 мг/кг 1× в неделю.

Фиг. 34B



*** Значимое преимущество в отношении выживаемости по сравнению с одним антителом к PD-1 (P<0,0001; логранговый критерий Мантеля-Кокса

Схема исследования: клетки EMT6, имплантируемые подкожно. Обработку начинали, когда опухоли в среднем достигали 30-60 мм^3. Антитело к PD-1, вводимое в дозе 10 мг/кг 2× в неделю; Ab6 (mIgG1), вводимое в дозе 10 мг/кг 1× в неделю.

Фиг. 34C

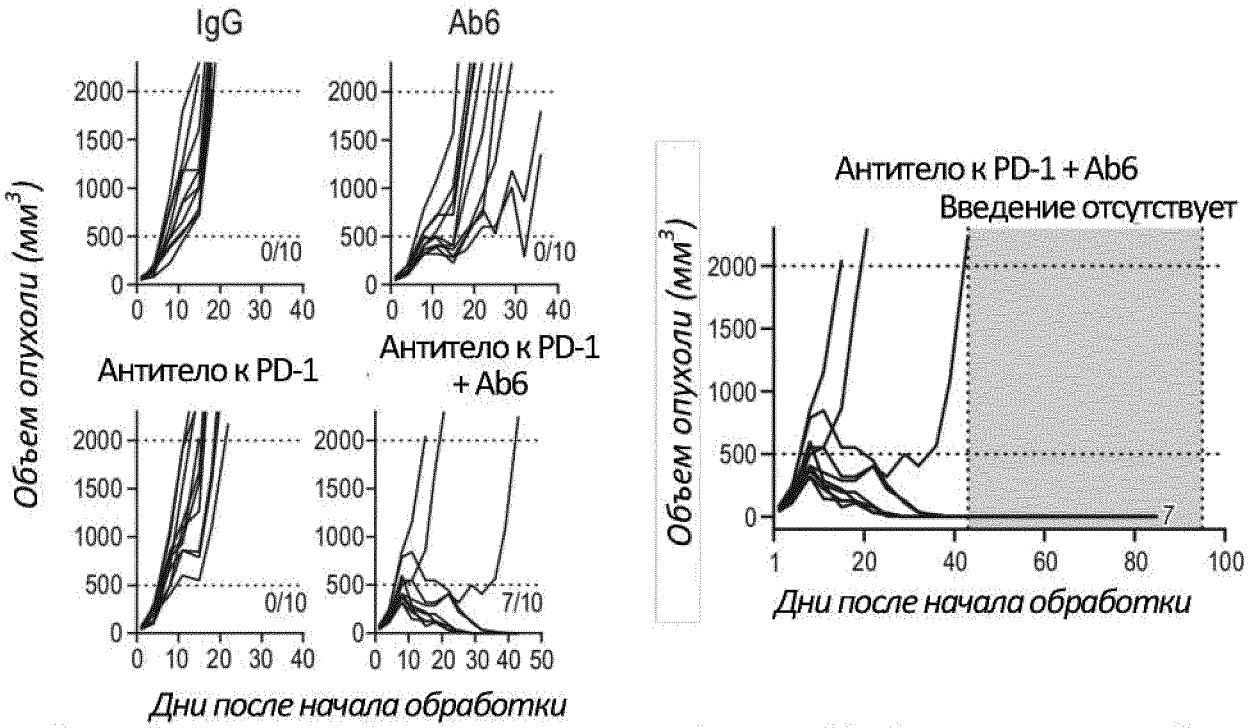


Схема исследования: клетки EMT6, имплантируемые подкожно. Обработку начинали, когда опухоли в среднем достигали 30-60 мм^3. Антитело к PD-1, вводимое в дозе 10 мг/кг 2× в неделю; Ab6 (mIgG1), вводимое в дозе 10 мг/кг 1× в неделю.

PD-1

Фиг. 34D

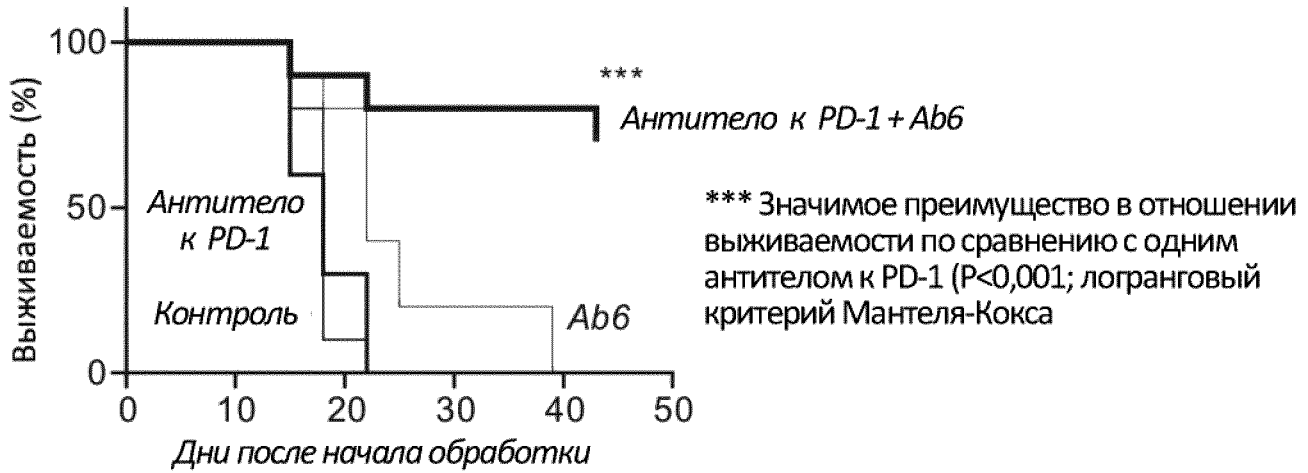
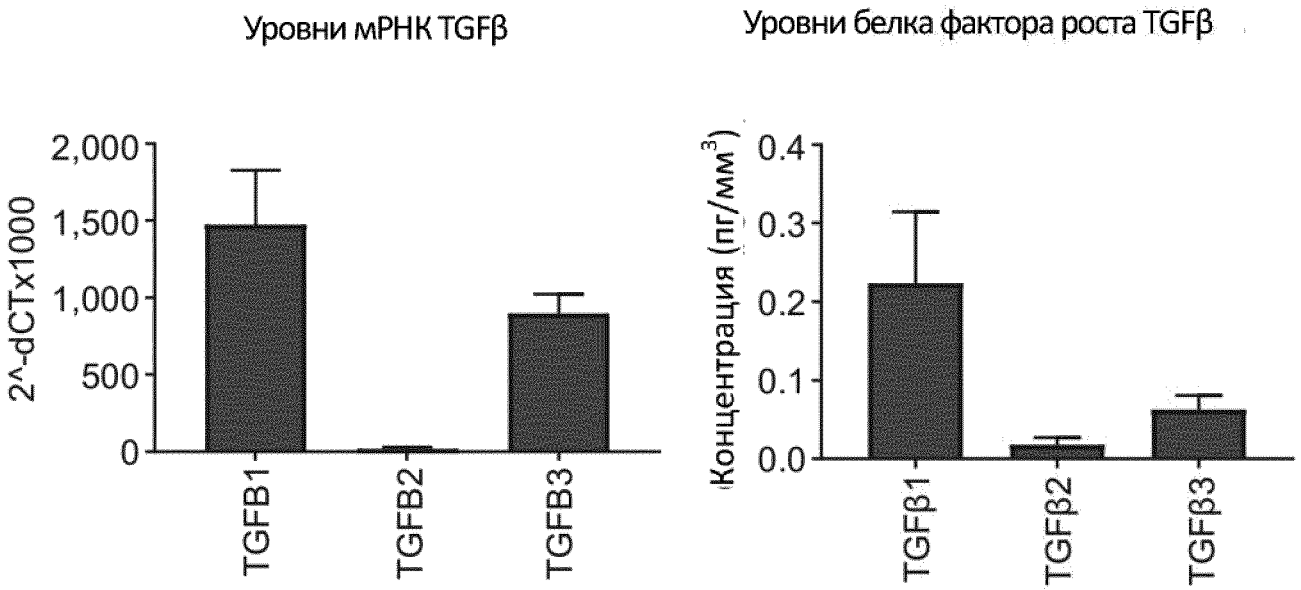


Схема исследования: клетки EMT6, имплантируемые подкожно. Обработку начинали, когда опухоли в среднем достигали 30-60 мм^3. Антитело к PD-1, вводимое в дозе 10 мг/кг 2× в неделю; Ab6 (mIgG1), вводимое в дозе 10 мг/кг 1× в неделю.

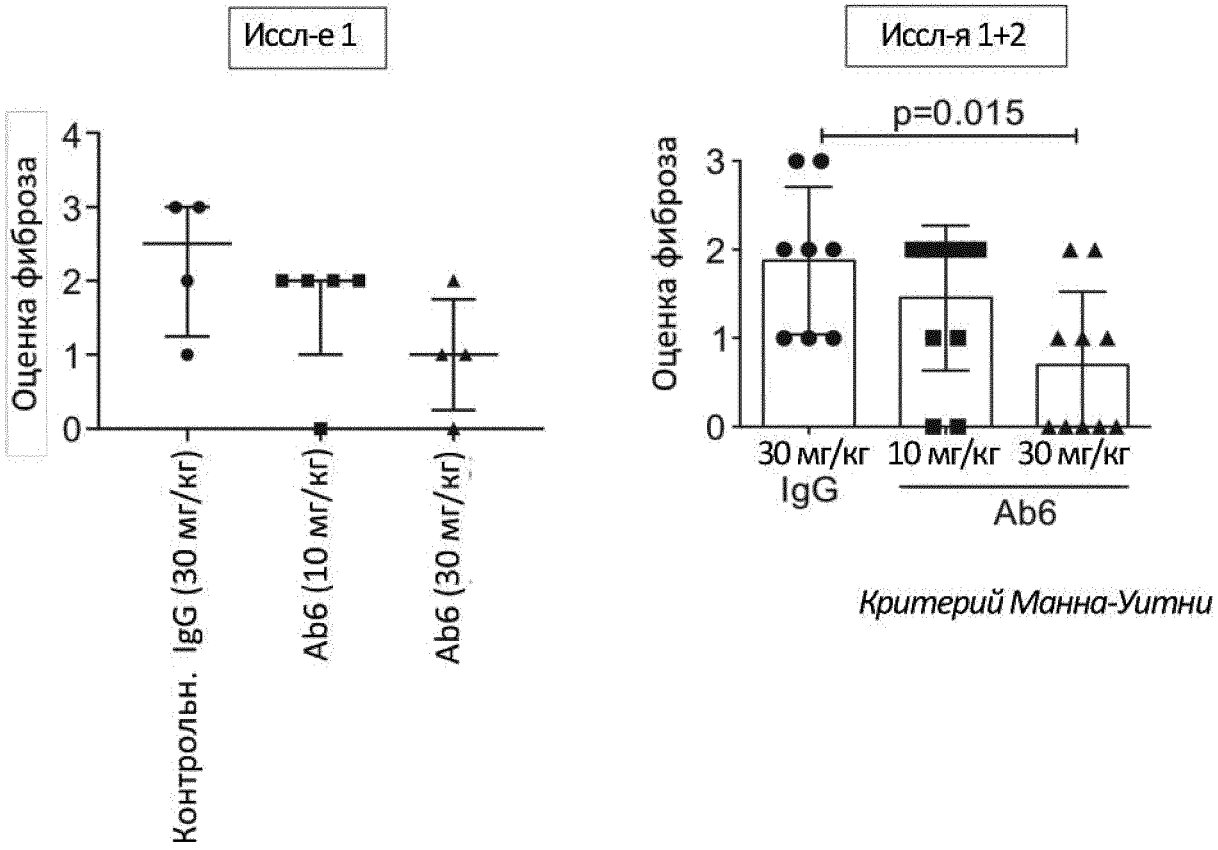
Фиг. 35


Уровни мРНК TGFβ
2^-dCTx1000
2,000
1,500
1,000
500
0
TGFB1
TGFB2
TGFB3
Уровни белка фактора роста TGFβ
Концентрация (пг/мм3)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
TGFβ1
TGFβ2
TGFβ3

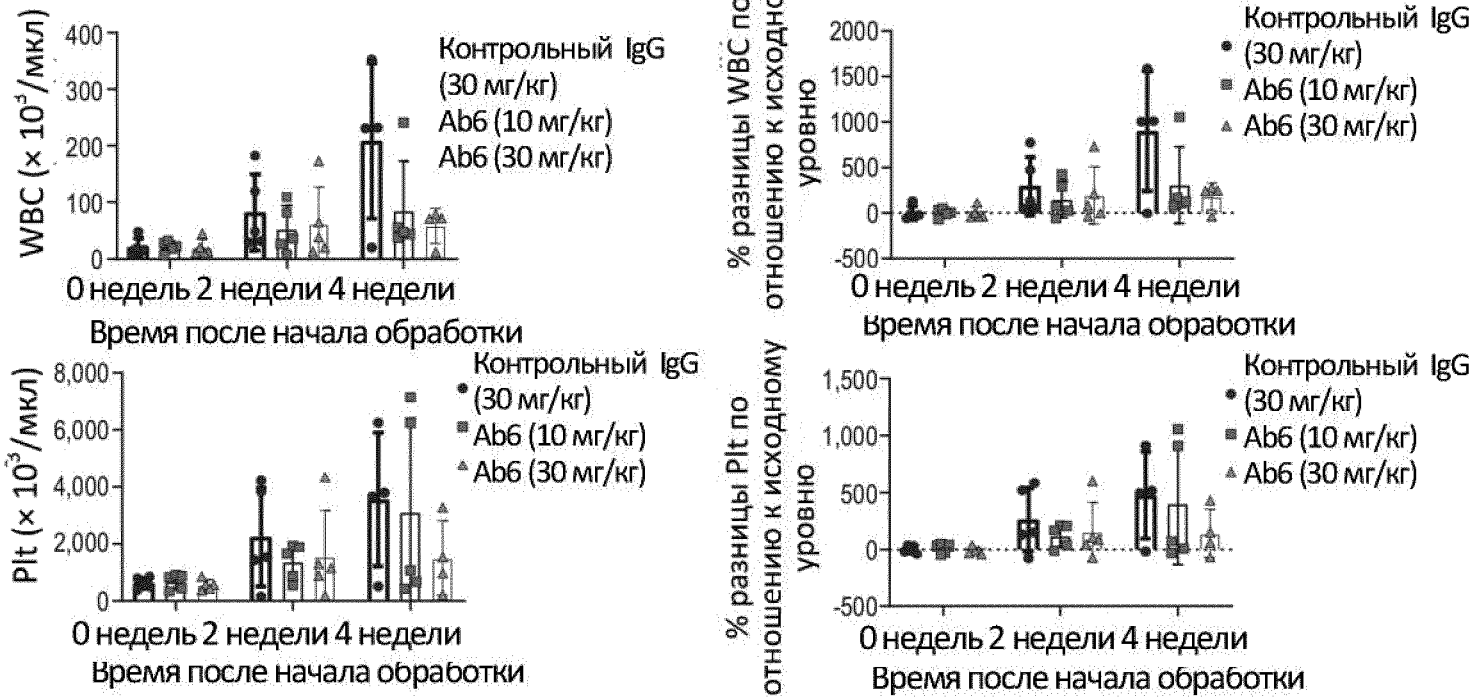
Фиг. 36A

Ретикулиновое окрашивание
(главным образом коллаген III типа)
Контрольный IgG (30 мг/кг)
AB6 mIgG1 (10 мг/кг)
AB6 mIgG1 (30 мг/кг)

Фиг. 36B

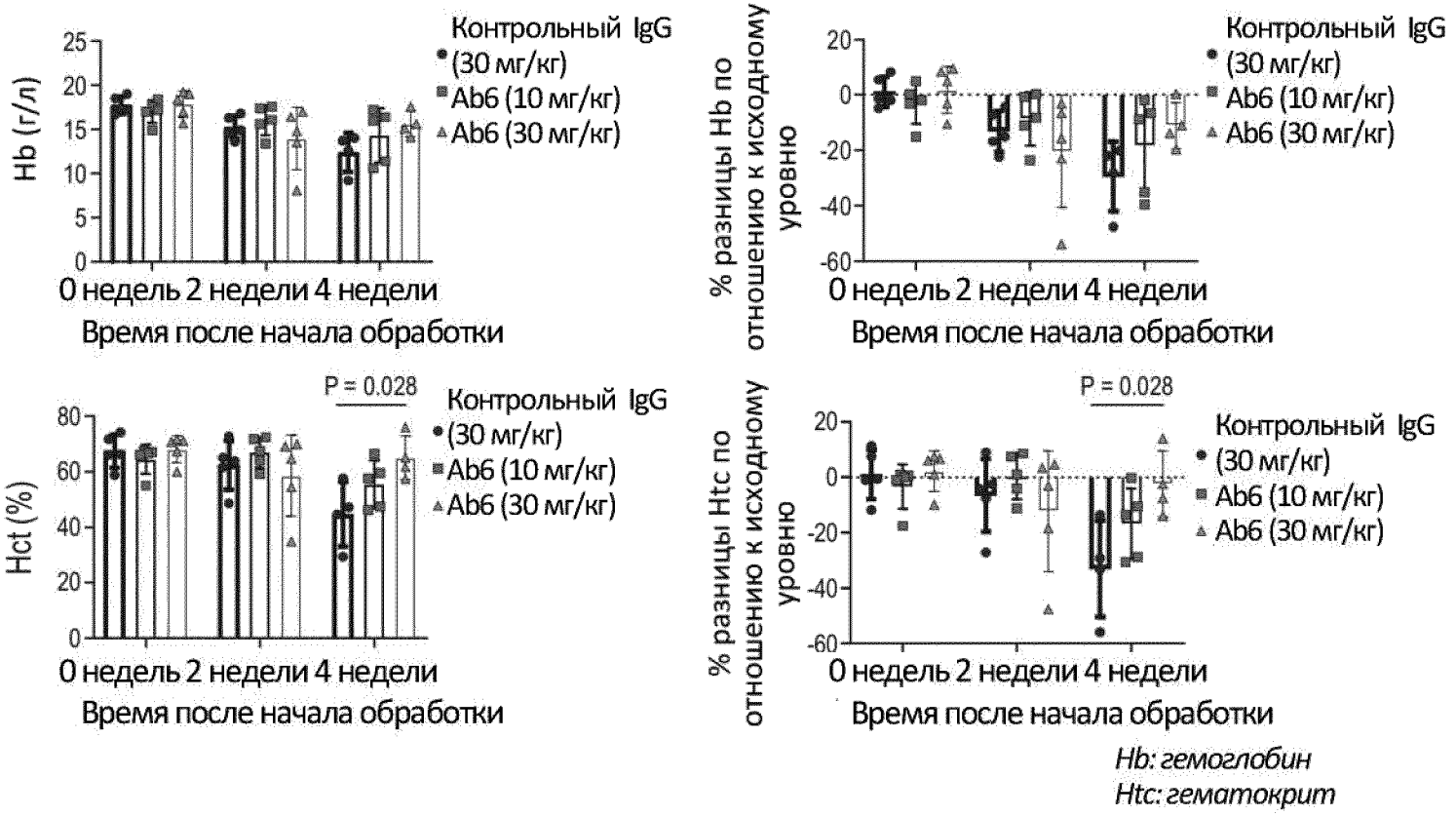

Иссл-е 1
Оценка фиброза
4
3
2
1
0
Контрольн. IgG (30 мг/кг)
Ab6 (10 мг/кг)
Ab6 (30 мг/кг)
Иссл-я 1+2
p=0.015
Оценка фиброза
3
2
1
0
30 мг/кг IgG
10 мг/кг
30 мг/кг
Ab6
Критерий Манна-Уитни

Фиг. 36C



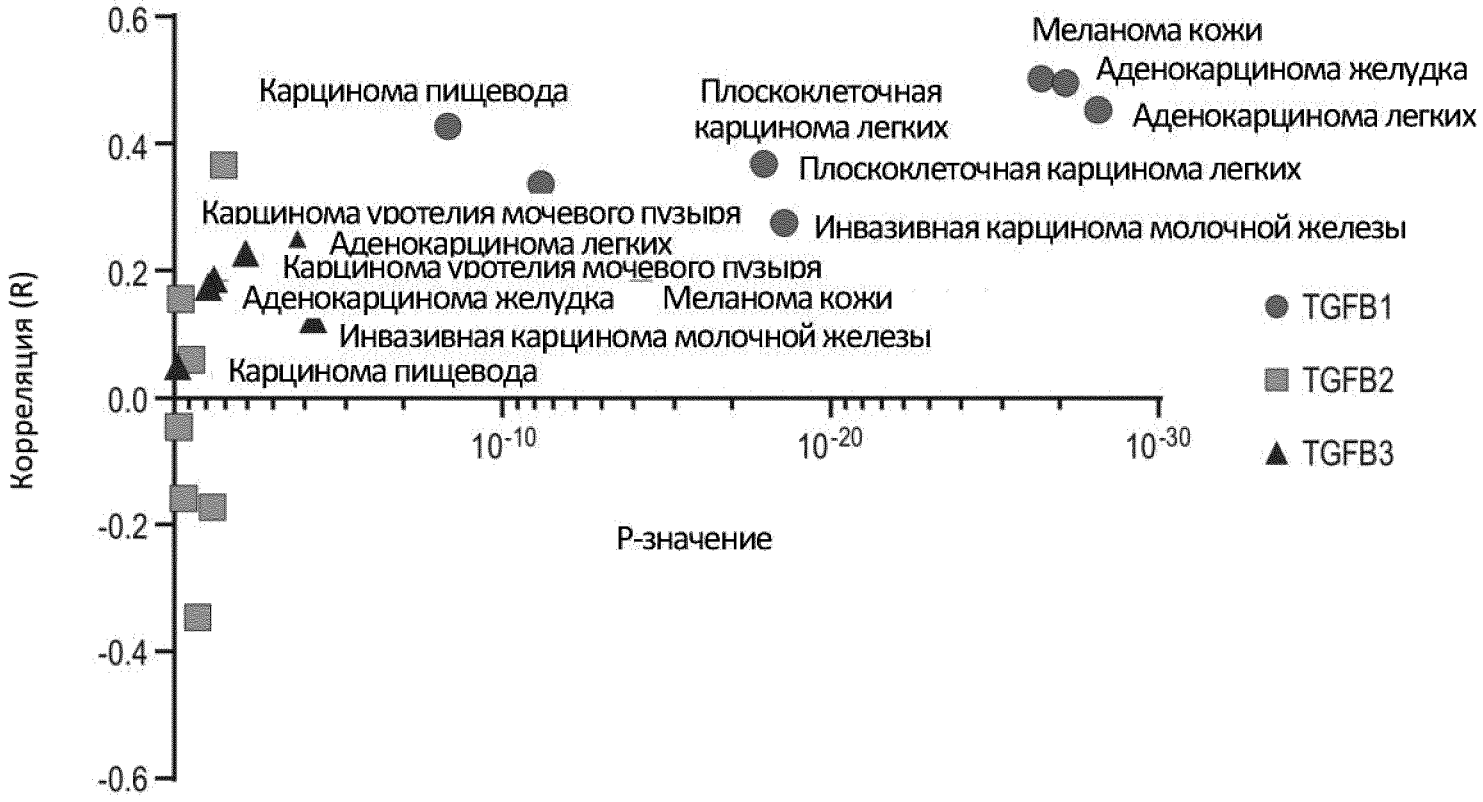
WBC: лейкоциты
Plt: тромбоциты

Фиг. 36D

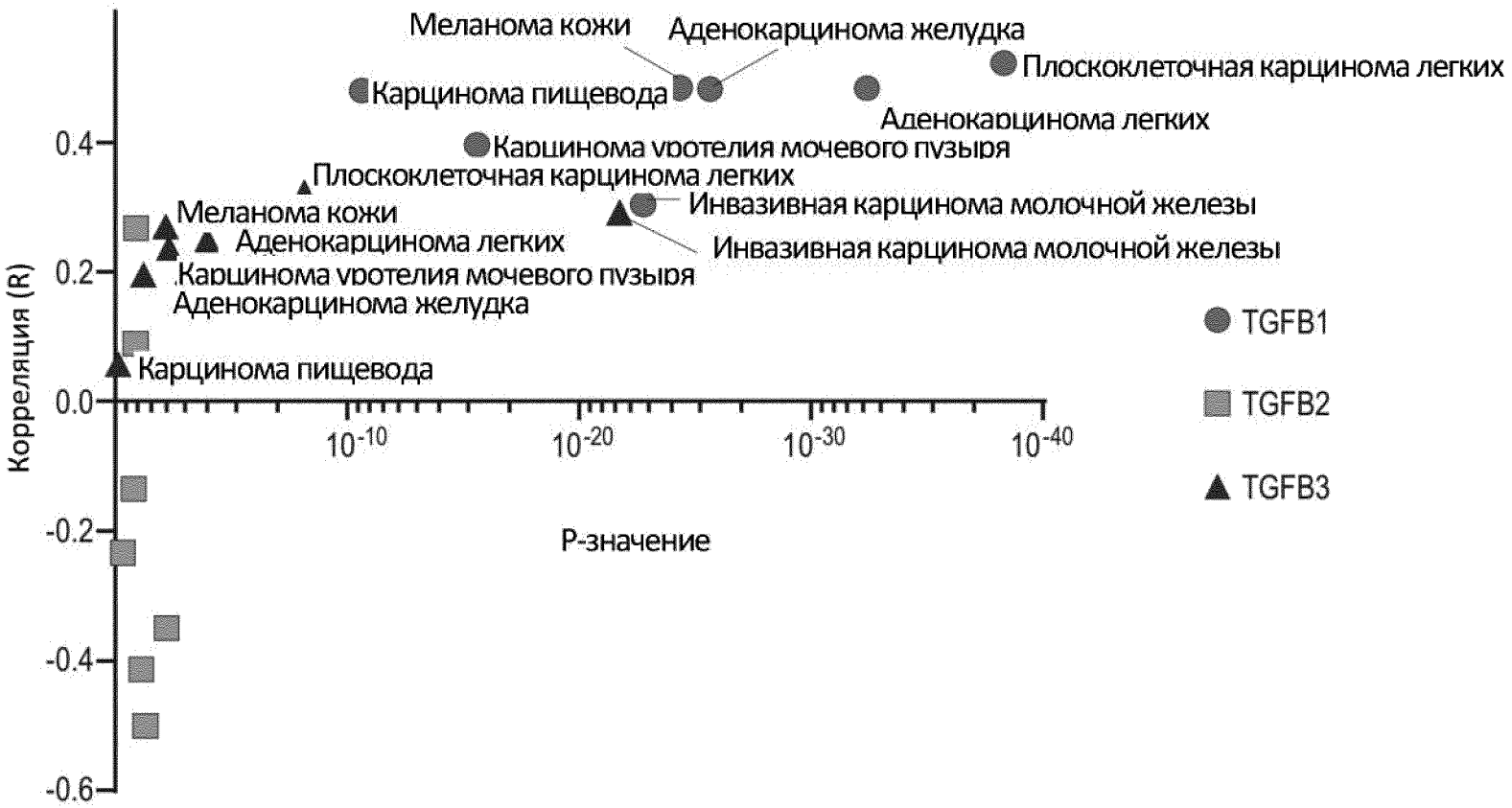


Hb: гемоглобин
Htc: гематокрит

Фиг. 37A


0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
-0.4
-0.6
Корреляция (R)
Карцинома пищевода
Плоскоклеточная карцинома легких
Меланома кожи
Аденокарцинома желудка
Аденокарцинома легких
Плоскоклеточная карцинома легких
Карцинома уротелия мочевого пузыря
Инвазивная карцинома молочной железы
Аденокарцинома легких
Карцинома уротелия мочевого пузыря
Аденокарцинома желудка
Меланома кожи
Инвазивная карцинома молочной железы
Карцинома пищевода
10^{-10}
10^{-20}
10^{-30}
P-значение
TGFB1
TGFB2
TGFB3

Фиг. 37B


Меланома кожи
Аденокарцинома желудка
Плоскоклеточная карцинома легких
Карцинома пищевода
Аденокарцинома легких
Карцинома уротелия мочевого пузыря
Плоскоклеточная карцинома легких
Инвазивная карцинома молочной железы
Меланома кожи
Аденокарцинома легких
Инвазивная карцинома молочной железы
Карцинома уротелия мочевого пузыря
Аденокарцинома желудка
Карцинома пищевода
0.4
0.2
0.0
-0.2
-0.4
-0.6
Корреляция (R)
10^{-10}
10^{-20}
10^{-30}
10^{-40}
P-значение
TGFB1
TGFB2
TGFB3