

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041300**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.05

(21) Номер заявки
201991729

(22) Дата подачи заявки
2018.01.19

(51) Int. Cl. **C07K 16/22** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К TGF-БЕТА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/448,800; 1730561.8**

(32) **2017.01.20**

(33) **US; EP**

(43) **2019.12.30**

(86) **PCT/IB2018/000088**

(87) **WO 2018/134681 2018.07.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САНОФИ (FR)

(72) Изобретатель:
**Шапиро Гари, Браун Кевин, Финн
Патрик, Грегори Ричард С., Кодури
Рао, Лю Фэн, Малкова Наталья,
Манку Парминдер, Поллард Джек Р.,
Цю Хуавэй, Тайльхабер Йоахим,
Винтер Кристофер, Юй Марчелла
(US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2014153435**

NEWMAN R. ET AL.: "Modification of the Fc region of a primatized IgG antibody to human CD4 retains its ability to modulate CD4 receptors but does not deplete CD4⁺ T cells in chimpanzees", Clinical immunology, Academic press, US, vol. 98, № 2, 1 February 2001 (2001-02-01), p. 164-174, XP001098835, ISSN: 1521-6616, DOI: 10.1006/CLIM.2000.4975, abstract
US-A1-2016289315

JOHN C. MORRIS ET AL.: "Phase I Study of GC1008 (Fresolimumab): A Human Anti-Transforming Growth Factor-Beta (TGF[beta]) Monoclonal Antibody in Patients with Advanced Malignant Melanoma or Renal Cell Carcinoma", PLOS ONE, vol. 9, № 3, 11 March 2014 (2014-03-11), p. e90353, XP055171683, DOI: 10.1371/journal.pone.0090353, the whole document
US-A1-2015203579
WO-A1-2016061142

(57) В настоящем изобретении предусмотрено улучшенное панспецифичное антитело к TGF-β для лечения состояний, опосредованных TGF-β, в том числе аутоиммунных заболеваний, фиброзных состояний и форм рака. Также предусмотрены способы и пути применения антитела в сочетании с другими иммуномодулирующими средствами, такими как антитело к PD-1.

B1**041300****041300 B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/448800 и заявке на европейский патент № 17305061.8, обе из которых поданы 20 января 2017 г. Раскрытие этих двух приоритетных заявок включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Копия указанного файла в формате ASCII, созданная 11 января 2018 г., имеет название 022548_WO011_SL.txt, и ее размер составляет 30458 байтов.

Предпосылки изобретения

Трансформирующий фактор роста бета (TGF- β) представляет собой цитокин, который контролирует многие ключевые клеточные функции, в том числе пролиферацию, дифференцировку, выживание, миграцию и эпителиально-мезенхимальный переход. Он регулирует различные биологические процессы, такие как образование внеклеточного матрикса, заживление ран, эмбриональное развитие, развитие костей, гемопоэз, иммунные и воспалительные ответы и злокачественная трансформация. Дeregуляция TGF- β приводит к патологическим состояниям, например врожденным дефектам, раку, хроническому воспалению и аутоиммунным и фиброзным заболеваниям.

TGF- β имеет три известных изоформы - TGF- β 1, 2 и 3. Все три изоформы первоначально транслируются в виде пропептида. После расщепления зрелый C-конец остается связанным с N-концом (называемым пептидом, ассоциированным с латентностью, или LAP), образуя малый латентный комплекс (SLC), который секретируется из клетки. Неспособность SLC связываться с рецептором TGF- β типа II (TGF β RII) препятствует вовлечению рецепторов. Активация при диссоциации N- и C-концов происходит по одному из нескольких механизмов, включая протеолитическое расщепление, воздействие кислого pH или структурные изменения интегрин (Connolly et al., Int. J. Biol. Sci. (2012), 8(7):964-78).

TGF- β 1, 2 и 3 являются плеiotропными по своей функции и характеризуются различными профилями экспрессии в разных типах клеток и тканей. Они имеют сходную активность in vitro, но отдельные нокауты в определенных типах клеток позволяют предположить неидентичные роли in vivo, несмотря на их общую способность связываться с одним и тем же рецептором (Akhurst et al., Nat. Rev. Drug. Discov. (2012), 11(10):790-811). При связывании TGF- β с TGF β RII конститутивная киназная активность рецептора обеспечивает фосфорилирование и активацию TGF β RI, который фосфорилирует SMAD2/3, обеспечивая возможность его ассоциации с SMAD4, локализации в ядре и транскрипции генов, отвечающих на TGF- β (там же). В дополнение к этому каноническому сигнальному каскаду по неканоническому сигнальному пути сигналы передаются через другие факторы, в том числе MAPK p38, PI3K, AKT, JUN, JNK и NF- κ B. Передача сигнала от TGF- β также модулируется другими сигнальными путями, в том числе WNT, Hedgehog, Notch, INF, TNF и RAS. Таким образом, конечным результатом передачи сигнала от TGF- β являются перекрестные взаимодействия всех этих сигнальных путей, которые интегрируют состояние и окружение клетки (там же).

С учетом разнообразных функций TGF- β существует потребность в панспецифичных терапевтических антителах к TGF- β , безопасных для пациентов-людей (Bedinger et al., mAbs. (2016), 8(2):389-404). Однако TGF- β является высококонсервативным среди различных видов. Вследствие этого получение антител к TGF- β человека у животных, таких как мыши, является сложной задачей.

Существует также медицинская потребность для пациентов, для которых в настоящее время нет эффективного лечения. Например, у более 50% пациентов с меланомой на поздней стадии в исследовании Checkmate-067 фазы III, получавших лечение посредством монотерапии с помощью антитела к PD1 ниволумаба, не наблюдался полный или частичный ответ на терапию (Larkin et al., N. Engl. J. Med. (2015), 373:23-34; Redman et al., BMC Med. (2016), 14:20-30).

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены улучшенные моноклональные антитела, которые специфично связываются с TGF- β 1, TGF β 2 и TGF- β 3 человека (т.е. панспецифичные в отношении TGF- β). Эти антитела менее склонны к образованию полуантител (т.е. димерного комплекса, имеющего одну тяжелую цепь и одну легкую цепь) во время изготовления. Они также характеризуются лучшими фармакокинетическими профилями, как, например, увеличенным периодом полужизни, и, таким образом, могут предоставлять улучшенную клиническую пользу пациентам. Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что при ингибировании TGF- β , как, например, под воздействием антител и их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению, ослабляется иммунодепрессивное микроокружение опухолей и усиливается эффективность иммунотерапии, такой как терапия, нацеленная на белок 1 программируемой гибели клеток (PD-1), лиганды PD-1 1 (PD-L1) и 2 (PD-L2).

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрено выделенное моноклональное антитело, которое специфично связывается с TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3 человека, содержащее области, определяющие комплементарность (CDR), 1-3 тяжелой цепи из SEQ ID NO: 1 и CDR1-3 легкой цепи из

SEQ ID NO: 2, где антитело содержит константную область IgG₄ человека с мутацией в положении 228 (нумерация по EU). В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой мутацию по типу замены серина на пролин (S228P). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи (V_H), соответствующую остаткам 1-120 в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи (V_L), соответствующую остаткам 1-108 в SEQ ID NO: 2. В дополнительных вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 1 (с С-концевым лизином или без него), и аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 2. В настоящем изобретении также представлен антигенсвязывающий F(ab')₂-фрагмент вышеупомянутого антитела.

В предпочтительных вариантах осуществления антитело или его фрагмент по настоящему изобретению характеризуются увеличенным периодом полужизни, увеличенным воздействием или и тем, и другим по сравнению с фрезолимумабом. Например, это увеличение представляет собой 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% или большее увеличение. Воздействие лекарственного средства, такого как антитело или его фрагмент по настоящему изобретению, зависит от концентрации лекарственного средства в организме во времени. Концентрация лекарственного средства в организме часто указывается по уровню лекарственного средства в крови, плазме крови или сыворотке крови. Период полужизни и воздействие (биологическое воздействие) лекарственного средства можно измерить хорошо известными способами, проиллюстрированными в примере 7 ниже.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрена композиция, содержащая антитело по настоящему изобретению, где композиция содержит менее 1% полуантител. Образование полуантител можно определить путем анализа чистоты препаратов моноклональных антител с помощью, например, капиллярного электрофореза в присутствии SDS в невосстанавливающих условиях, или анализа методом SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях с последующей денситометрией, или RP-HPLC (Angal et al., Mol. Immunol. (1993), 30(1):105-8; Bloom et al., Protein Science (1997), 6:407-415; Schuurman et al. (2001), 38(1):1-8; и Solanos et al., Anal. Chem. (2006), 78:6583-94). В некоторых вариантах осуществления эта композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую также фармацевтически приемлемый наполнитель.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ ингибирования передачи сигнала от TGF-β у пациента (человека), нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтического количества антитела или его фрагмента по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет иммуноопосредованное заболевание (например, склеродермию), фиброзное состояние (например, фиброзное состояние почек, такое как фокально-сегментарный гломерулосклероз (FSGS), или фиброзное состояние легких, такое как идиопатический легочный фиброз), или врожденный дефект или дефект костей (например, несовершенный остеогенез). В некоторых вариантах осуществления пациент имеет рак. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, применяемые в способе, ингибируют дифференцировку CD4⁺ Т-клеток в индуцируемые регуляторные Т-клетки (iTreg). Антитело или его фрагмент могут ослаблять иммунодепрессивное микроокружение опухоли. Это действие антитела или его фрагмента помогает активировать иммунную систему и усиливает эффективность иммунотерапии. На эффективность способов лечения, описанных в данном документе, может указывать, например, одно или несколько из следующего у пациента (например, в опухолевой ткани пациента):

- (1) увеличения уровней MIP2 и/или KC/GRO;
- (2) активации или инфильтрации в опухолевую ткань CD8⁺ Т-клеток, таких как INF-γ-положительные CD8⁺ Т-клетки; и
- (3) увеличения образования скоплений естественных клеток-киллеров (NK).

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ лечения рака у пациента (человека), включающий введение пациенту (1) терапевтически эффективного количества антитела или его фрагмента по настоящему изобретению и (2) терапевтически эффективного количества ингибитора белка, представляющего собой контрольную точку иммунного ответа. Эти два средства можно вводить одновременно (например, в одной композиции или в отдельных композициях) или последовательно в любом порядке. Два средства можно, например, вводить в один и тот же день. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство (1) вводят пациенту до (например, за один или несколько дней до) введения терапевтического средства (2).

В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий собой контрольную точку иммунного ответа, представляет собой PD-1, PD-L1 или PD-L2. В дополнительных вариантах осуществления ингибитор белка, представляющего собой контрольную точку иммунного ответа, представляет собой антитело к PD-1. В дополнительных вариантах осуществления антитело к PD-1 содержит

- (1) CDR1-3 тяжелой цепи из SEQ ID NO: 5 и CDR1-3 легкой цепи из SEQ ID NO: 6;
- (2) аминокислотную последовательность V_H, соответствующую остаткам 1-117 в SEQ ID NO: 5, и аминокислотную последовательность V_L, соответствующую остаткам 1-107 в SEQ ID NO: 6; или
- (3) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 5

(с С-концевым лизином или без него), и аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 6. В одном конкретном варианте осуществления способ включает введение пациенту с раком антитела к TGF- β , содержащего аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 1 (с С-концевым лизином или без него), и аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 2, и антитела к PD-1, содержащего аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 5 (с С-концевым лизином или без него), и аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления пациент является невосприимчивым к монотерапии с помощью антитела к PD-1. У пациента может быть меланома на поздней стадии или метастатическая меланома или плоскоклеточная карцинома кожи.

В некоторых схемах антитело к TGF- β и антитело к PD-1 вводят пациенту раз в 2 недели или раз в 3 недели. В некоторых схемах вводят соответственно два средства в дозе 0,01-40 (например, 0,02-20, 0,05-15 или 0,05-20) мг/кг массы тела.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ увеличения интенсивности иммунного ответа у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту ингибитора контрольных точек иммунного ответа и антитела или его фрагмента по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой антитело к PD-1, как, например, антитело, содержащее

(1) HCDR1-3 из SEQ ID NO: 5 и LCDR1-3 из SEQ ID NO: 6;

(2) V_H и V_L, соответствующие остаткам 1-117 в SEQ ID NO: 5 и остаткам 1-107 в SEQ ID NO: 6 соответственно; или

(3) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5 (с С-концевым лизином или без него), и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6.

Способы по настоящему изобретению можно применять для лечения различных форм рака, в том числе без ограничения меланомы (например, метастатической меланомы или меланомы на поздней стадии), рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого), плоскоклеточной карциномы кожи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака фаллопиевой трубы, рака матки, рака головы и шеи (например, плоскоклеточной карциномы головы и шеи), рака печени (например, гепатокарциномы), рака уротелия и рака почки (например, почечноклеточной карциномы). В некоторых вариантах осуществления пациент имеет мезенхимальную опухоль или солидную опухоль мезенхимального подтипа. Примеры такой солидной опухоли включают опухоли в толстой кишке (например, колоректальный рак), яичнике, голове и шее (например, плоскоклеточную карциному головы и шеи), печени (например, гепатоцеллюлярную карциному) и уротелии мочеполовой системы.

В некоторых вариантах осуществления рак, в том числе мезенхимальная опухоль, может характеризоваться сверхэкспрессией одного или нескольких из ACTA2 (α 2-актина гладких мышц), VIM (виментина), MGP (Gla-белка матрикса), ZWINT (кинетохорного белка, взаимодействующего с ZW10) и ZEB2 (белка гомеобокса 2 с "цинковыми пальцами", связывающегося с E-боксом). Уровни экспрессии таких биомаркеров можно определить, например, на уровне мРНК или уровне белка в биологическом образце от пациента, таком как биоптат опухоли или циркулирующие опухолевые клетки.

В настоящем изобретении также предусмотрены вышеупомянутые антитела, фрагменты или композиции для применения в лечении состояний, описанных в данном документе, а также применение вышеупомянутых антител, фрагментов или композиций при изготовлении лекарственных препаратов, предназначенных для лечения состояний, описанных в данном документе.

Также в настоящее изобретение включены векторы экспрессии на основе нуклеиновых кислот, кодирующие тяжелую или легкую цепь антитела по настоящему изобретению или их обе; клетки-хозяева, содержащие последовательности, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь антитела; и способы получения антитела с использованием клеток-хозяев, включающие стадии культивирования клеток-хозяев в подходящей культуральной среде для обеспечения возможности экспрессии генов антитела и последующего сбора антитела.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1A-1E представляют собой графики, на которых показаны эффекты Ab1, фрезелиумаба и 1D11 в отношении пролиферации клеток легкого норки (Mv 1 Lu), обработанных 1 нг/мл TGF- β 1 человека (A), TGF- β 2 человека (B), TGF- β 3 человека (C), TGF- β 1 мыши (D) или TGF- β 2 мыши (E). Концентрация антител выражена в мкг/мл.

Фиг. 2 представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показан эффект 50 мкг/мл Ab1 в отношении дифференцировки в индуцируемые регуляторные Т-клетки (iTreg) человека. Стимуляция, полученная Т-клетками, представляла собой воздействие антител к CD3 и антител к CD28 вместе с IL-2.

Фиг. 3 представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показан эффект Ab1 в отношении дифференцировки в индуцируемые регуляторные Т-клетки (iTreg) человека в культурах CD4⁺ Т-клеток человека, обработанных 2 нг/мл TGF- β 1 человека. Стимуляция, полученная Т-клетками, представляла собой воздействие антител к CD3 и антител к CD28 вместе с IL-2.

Фиг. 4 представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показан эффект Ab1 (30 мкг/мл) и TGF- β 1 человека (18 нг/мл) в отношении экспрессии люциферазы, управляемой NFATc, в Т-клетках Jurkat после стимуляции Т-клеток и обработки антителами к PD-1.

Фиг. 5 представляет собой график, на котором показаны медианные объемы опухолей с абсолютными отклонениями медианы (MAD) в указанных группах обработки при использовании модели опухоли толстой кишки из MC38 у мышей C57BL/6. Среда-носитель: PBS. "Антитело к PD-1": Mab x-anti-mPD-1 (см. подробное описание изобретения ниже). "Изотипический контроль для Ab1": антитело hIgG4 к HEL.

Фиг. 6 представляет собой точечную диаграмму рассеяния, на которой показаны изменения объема опухоли относительно исходного уровня в день 27 после указанной обработки при использовании модели опухоли толстой кишки из MC38 у мышей C57BL/6. Контроль: PBS. "Антитело к PD-1 mlgG1 RPM114": Mab x-anti-mPD-1.

Фиг. 7A-7F представляют собой графики, на которых показано изменение объемов опухолей с течением времени для каждой указанной группы обработки при использовании модели опухоли толстой кишки из MC38 у мышей C57BL/6. Каждая линия на графиках представляет одно животное. "mpk": мкг/кг. "Изотипический контроль для Ab1": антитело hIgG4 к HEL. α PD1: Mab x-anti-mPD-1.

Фиг. 8 представляет собой график, на котором показаны эффекты Ab1 в отношении концентрации активного TGF- β 1 в лизатах опухолей из LoVo.

Фиг. 9A представляет собой график, на котором показано изменение концентрации Ab1 и фрезолимумаба в сыворотке крови с течением времени в пяти группах крыс, которым давали однократную дозу какого-либо антитела в количестве 5 мг/кг. Группам (гр.) 1-3 давали три разные партии (B1, B2 и B3) фрезолимумаба. Группам 4 и 5 давали две разные партии (B1 и B2) Ab1.

Фиг. 9B представляет собой график, на котором показано изменение концентрации Ab1 и фрезолимумаба в сыворотке крови с течением времени у обезьян, которым давали однократную дозу какого-либо антитела в количестве 1 мг/кг.

Фиг. 9C представляет собой график, на котором показано изменение концентрации Ab1 и фрезолимумаба в сыворотке крови с течением времени у обезьян, которым давали пять еженедельных доз Ab1 в количестве 1 мг/кг на дозу или дозы фрезолимумаба раз в две недели в количестве 1 мг/кг на дозу в течение указанной продолжительности исследования.

Фиг. 9D представляет собой график, на котором показано изменение концентрации Ab1 и фрезолимумаба в сыворотке крови с течением времени у обезьян, которым давали однократную дозу какого-либо антитела в количестве 10 мг/кг.

Фиг. 9E представляет собой график, на котором показано изменение концентрации Ab1 и фрезолимумаба в сыворотке крови с течением времени у обезьян, которым давали пять еженедельных доз Ab1 в количестве 10 мг/кг на дозу или доз фрезолимумаба раз в две недели в количестве 10 мг/кг на дозу в течение указанной продолжительности исследований.

Фиг. 10A представляет собой график, на котором показаны изменения уровней TGF- β 1 в опухолях из MC38 после обработки с помощью Ab1 ($\pm$ антитело к PD1).

Фиг. 10B представляет собой график, на котором показаны изменения уровней MIP-2 в опухолях из MC38 после обработки с помощью Ab1 ($\pm$ антитело к PD1).

Фиг. 10C представляет собой график, на котором показаны изменения уровней KC/GRO в опухолях из MC38 после обработки с помощью Ab1 ($\pm$ антитело к PD1).

Фиг. 11A представляет собой графики, дающие количественную оценку окрашивания CellTrace фиолетовым и окрашивания на IFN- γ в CD8-положительных клетках.

Фиг. 11B представляет собой график, на котором показано, что Ab1 восстанавливало как пролиферацию, так и выработку IFN- γ в CD8⁺ Т-клетках, обработанных TGF β .

Фиг. 12A представляет собой график, на котором показано относительное обилие CD8⁺ Т-клеток ($\log_2$ -преобразованное) в пределах набора сингенных мышинных моделей опухолей для рака толстой кишки, лейкоза, рака легкого, лимфомы, рака молочной железы, меланомы, мезотелиомы и рака почки.

Фиг. 12B представляет собой график, на котором показана активация сигнального пути TGF β в пределах набора сингенных мышинных моделей опухолей для рака толстой кишки, лейкоза, рака легкого, лимфомы, рака молочной железы, меланомы, мезотелиомы и рака почки.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении представлены улучшенные панспецифичные моноклональные антитела к TGF- β , которые менее склонны к образованию полуантител, а также характеризуются лучшими фармакокинетическими профилями, как, например, более высоким уровнем воздействия в организме, чем известные ранее антитела. Антитела по настоящему изобретению в совокупности называются "Ab1 и родственными антителами" и имеют общие структурные характеристики: они содержат CDR тяжелой цепи (HCDR) 1-3 из SEQ ID NO: 1 и CDR легкой цепи (LCDR) 1-3 из SEQ ID NO: 2 и содержат константную область IgG₄ человека, где остаток 228 (нумерация по EU) в шарнирной области был подвергнут мутации по типу замены серина на пролин. P228 заключен в рамку и выделен жирным шрифтом в последователь-

ности под SEQ ID NO: 1, показанной ниже.

Антитело Ab1 имеет оценочную молекулярную массу 144 кДа в негликозилированной форме. Аминокислотные последовательности его тяжелой и легкой цепей представляют собой соответственно SEQ ID NO: 1 и 2. Эти две последовательности показаны ниже. Вариабельные домены выделены курсивом. CDR показаны в рамках. Сайт гликозилирования в константном домене тяжелой цепи выделен жирным шрифтом (N297).

<i>QVQLVQSGAE</i>	<i>VKKPGSSVKV</i>	<i>SCKASGYTFS</i>	<i>SNVIS</i>	<i>WVRQA</i>	<i>PGQGLEWMG</i>
<i>VIPIVDIANY</i>					
<i>AQRFKGRVTI</i>	<i>TADESTSTTY</i>	<i>MELSSLRSED</i>	<i>TAVYYCAS</i>	<i>TL</i>	<i>GLVLDAMDY</i>
<i>GQGTLLVTSS</i>					
<i>ASTKGPSVFP</i>	<i>LAPCSRSTSE</i>	<i>STAALGCLVK</i>	<i>DYFPEPVTVS</i>		<i>WNSGALTSGV</i>
<i>HTFPAVLQSS</i>					
<i>GLYSLSSVVT</i>	<i>VPSSSLGTKT</i>	<i>YTCNVDHKPS</i>	<i>NTKVDKRVES</i>		<i>KYGPPCP</i>
<i>APEFLGGPSV</i>					
<i>FLFPPKPKDT</i>	<i>LMISRTPEVT</i>	<i>CVVVDVSQED</i>	<i>PEVQFNWYVD</i>		<i>GVEVHNAKTK</i>
<i>PREEQFNSTY</i>					
<i>RVVSVLTVLH</i>	<i>QDWLNGKEYK</i>	<i>CKVSNKGLPS</i>	<i>SIEKTISKAK</i>		<i>GQPREPQVYT</i>
<i>LPPSQEEMTK</i>					
<i>NQVSLTCLVK</i>	<i>GFYPSDIAVE</i>	<i>WESNGQPENN</i>	<i>YKTTTPVLDS</i>		<i>DGSFFLYSRL</i>
<i>TVDKSRWQEG</i>					
<i>NVFSCSVME</i>	<i>ALHNHYTQKS</i>	<i>LSLSLGK</i>	(SEQ ID NO:1)		
<i>ETVLTQSPGT</i>	<i>LSLSPGERAT</i>	<i>LSQ</i>	<i>RASQSLG</i>	<i>SSYLA</i>	<i>WYQQK</i>
<i>GASSRAFGIP</i>					<i>PGQAPRLLIY</i>
<i>DRFSGSGSGT</i>	<i>DFTLTISRLE</i>	<i>PEDFAVYYCQ</i>	<i>QYADSPIT</i>	<i>FG</i>	<i>QGTRLEIKRT</i>
<i>VAAPSVFIFP</i>					
<i>PSDEQLKSGT</i>	<i>ASVVCLLNNF</i>	<i>YPREAKVQWK</i>	<i>VDNALQSGNS</i>		<i>QESVTEQDSK</i>
<i>DSTYSLSSTL</i>					
<i>TLSKADYEKN</i>	<i>KVYACEVTHQ</i>	<i>GLSSPVTKSF</i>	<i>NRGEC</i>	(SEQ ID NO:2)	

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению, такие как антитела к TGF-β, не имеют С-концевого лизина в тяжелой цепи. С-концевой лизин может быть удален во время изготовления или с помощью рекомбинантной технологии (т.е. последовательность, кодирующая тяжелую цепь, не содержит кодон для С-концевого лизина). Таким образом, в рамках настоящего изобретения также рассматриваются антитела, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 1 без С-концевого лизина.

Ab1 и родственные антитела специфично связываются с TGF-β1, β32 и β33 человека. Под выражением "специфично" подразумевается, что связывание характеризуется K_D менее 10^{-7} М, как, например, менее 10^{-8} М (например, 1-5 нМ), определяемой с помощью, например, поверхностного плазмонного резонанса (см., например, пример 1 ниже) или интерферометрии биослоя. Ab1 и родственные антитела также могут характеризоваться сильной действенностью нейтрализации TGF-β при оценке в анализе эпителиальных клеток легкого норки (см., например, пример 2 ниже) или EC₅₀ от приблизительно 0,05 до 1 мкг/мл, определяемой в анализе индукции IL-11 в клетках A549 (см., например, пример 6 в публикации согласно PCT WO 2006/086469, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Эти антигенсвязывающие и нейтрализующие свойства Ab1 и родственных антител сравнимы с ранее известным антителом к TGF-β фрезолимумабом (антителом IgG₄ PET1073G12 в конфигурации зародышевой линии, описанным в WO 2006/086469).

Последовательности тяжелой и легкой цепей фрезолимумаб, в том числе лидерные последовательности, показаны соответственно под SEQ ID NO: 3 и 4. Как видно в SEQ ID NO: 3, фрезолимумаб не имеет пролина в положении 228 (нумерация по EU, которая соответствует фактическому положению 247 в SEQ ID NO: 3). Ab1 и родственные антитела имеют несколько улучшенных характеристик по сравнению с фрезолимумабом.

При изготовлении фрезолимумаб может образовывать до 6-18% полуантител (т.е. димеров, имеющих тяжелую цепь и легкую цепь, а не тетрамеров, имеющих две тяжелые цепи, образующие комплекс с двумя легкими цепями) в невосстанавливающих денатурирующих условиях. В отличие от этого Ab1 дает значительно меньше полуантител (<1%). Таким образом, Ab1 и родственные антитела дают более чистый лекарственный препарат в процессе изготовления.

Кроме того, Ab1 и родственные антитела могут характеризоваться улучшенными фармакокине-

ческими (РК) профилями по сравнению с фрезолиумабом. Они могут иметь линейный характер РК-профиля с гораздо более длительным периодом полужизни и более низкой скоростью выведения, чем у фрезолиумаба, что приводит к увеличению воздействия *in vivo* приблизительно в 1,7 раза по сравнению с фрезолиумабом. Например, у крыс было показано, что Ab1 характеризовалось средним периодом полужизни 7,1 дня по сравнению с 4,3 дня для фрезолиумаба, а его скорость выведения (CL) составляла 0,30 мл/ч/кг по сравнению с 0,51 мл/ч/кг для фрезолиумаба (пример 7 ниже). У макаков-крабоедов было показано, что Ab1 характеризовалось средним периодом полужизни 13 дней по сравнению с 4,5 дня для фрезолиумаба, а его скорость выведения (CL) составляла 0,40 мл/ч/кг по сравнению с 0,66 мл/час/кг для фрезолиумаба (там же). Эти улучшенные РК-свойства позволяют предположить, что Ab1 и родственные антитела можно давать пациентам в более низкой дозе и/или с меньшей частотой, чем фрезолиумаб, с достижением такой же или лучшей клинической эффективности, вызывая при этом меньше нежелательных побочных эффектов и менее интенсивную реакцию образования антител к лекарственному средству, что обеспечивает возможность более продолжительного лечения в случае необходимости.

Кроме того, во время токсикологических исследований фрезолиумаба у приматов, отличных от человека, наблюдалась корреляция между воздействием лекарственного средства и нежелательными явлениями, такими как анемия. Однако в аналогичных исследованиях, проведенных с Ab1 при эквивалентном или даже более высоком уровне воздействия, таких явлений не наблюдалось.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, авторы настоящего изобретения утверждают, что мутация остатка 228 в тяжелой цепи Ab1 и родственных антител приводит к увеличению стабильности, а также к улучшению РК-профилей и токсикологических профилей.

Константный домен Ab1 и родственных антител можно дополнительно модифицировать в случае необходимости, например, в остатке L248 согласно Rabat (например, путем введения мутации L248E), чтобы уменьшить любую нежелательную эффекторную функцию молекулы.

Используемый в данном документе термин "антитело" (Ab) или "иммуноглобулин" (Ig) относится к тетрамерному белку, содержащему две тяжелые (H) цепи (приблизительно 50-70 кДа) и две легкие (L) цепи (приблизительно 25 кДа), связанные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельного домена тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи (C_H). Каждая легкая цепь состоит из вариабельного домена легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи (C_L). V_H - и V_L -домены могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые "областями, определяющими комплементарность" (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми "каркасными областями" (FR). Каждый из V_H или V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Отнесение аминокислот к каждой из областей можно осуществлять в соответствии с определениями IMGT® (Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol., 27(1):55-77 (2003)) или определениями по Rabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 и 1991); Chothia & Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); или Chothia et al., Nature, 342:878-883 (1989)).

Термин "антитело человека" относится к антителу, в котором последовательности вариабельного домена и константной области получены из последовательностей человека. Термин охватывает антитела с последовательностями, полученными из генов человека, при этом данные последовательности были модифицированы, например, для уменьшения иммуногенности, увеличения аффинности и увеличения стабильности. Термин охватывает антитела, полученные рекомбинантным путем в клетках, отличных от человеческих, которые могут придавать гликозилирование, не характерное для клеток человека.

Термин "химерное антитело" относится к антителу, которое содержит последовательности из двух разных видов животных. Например, химерное антитело может содержать V_H и V_L из антитела мыши (т.е. антитела, кодируемого генами антитела мыши, такого как антитело, полученное от иммунизированной мыши с использованием гибридомной технологии), связанные с константными областями антитела из другого вида (например, человека, кролика или крысы).

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" антитела относится к фрагменту антитела, который сохраняет способность специфично связываться с антигеном. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению представляет собой $F(ab')_2$ -фрагмент, который является бивалентным фрагментом, содержащим два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области (Fab представляет собой моновалентный фрагмент антитела, состоящий из V_L -, V_H -, C_L - и C_{H1} -доменов). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению также может содержать C_{H2} - или C_{H3} -домен.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут быть выделенными. Термин "выделенный белок", "выделенный полипептид" или "выделенное антитело" относится к белку, полипептиду или антителу, которые в силу своего происхождения или источника получения

(1) не связаны с естественным образом связанными с ними компонентами, сопутствующими им в их нативном состоянии;

(2) по существу не содержат других белков из того же вида;

(3) экспрессируются клеткой из другого вида; или

(4) не встречаются в природе.

Таким образом, полипептид, синтезированный химическим путем или синтезированный в клеточной системе, отличной от клетки, из которой он происходит естественным образом, будет "выделенным" из естественным образом связанных с ним компонентов. Белок также можно сделать практически не содержащим естественным образом связанных с ним компонентов путем выделения с использованием методов очистки белка, хорошо известных из уровня техники.

I. Применение Ab1 и родственных антител.

Рецептор TGF- β широко экспрессируется на иммунных клетках, что приводит к обширным эффектам TGF- β как во врожденной, так и в адаптивной иммунной системе. TGF- β связан со многими болезненными состояниями, например врожденными дефектами, раком, хроническим воспалением, аутоиммунитетом и фиброзными заболеваниями. Терапевтическое количество Ab1 или родственного антитела можно применять для лечения этих состояний. "Терапевтически эффективное" количество относится к количеству Ab1, родственного антитела или другого терапевтического средства, упомянутого в данном документе, которое ослабляет один или несколько симптомов состояния, подвергаемого лечению. Это количество может варьироваться в зависимости от состояния или пациента, подвергаемого лечению, и может быть определено медицинским работником с использованием прочно установившихся принципов.

В некоторых вариантах осуществления Ab1 или родственное антитело можно вводить в дозе 40, 20 или 15 мг/кг или меньше (такой как 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, или 1 мг/кг). В некоторых дополнительных вариантах осуществления дозы могут составлять 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, или 0,5 мг/кг. Частота введения доз может составлять, например, раз в день, раз в два, три, четыре или пять дней, раз в неделю, раз в две недели или раз в три недели, раз в месяц или раз в два месяца. Антитело можно вводить внутривенным (например, путем внутривенной инфузии в течение 0,5-8 ч), подкожным, местным или любым другим путем введения, который подходит для состояния и лекарственной формы.

Ab1 и родственные антитела получены из генов антител человека и, таким образом, характеризуются низкой иммуногенностью у людей. Токсикологические исследования Ab1 подробно описаны в примере 8 ниже. Определенные сердечные и легочные побочные эффекты наблюдали у крыс. Таким образом, у пациентов можно контролировать нежелательные явления при лечении пациентов с помощью Ab1 или родственных антител.

В некоторых вариантах осуществления на эффективность антител по настоящему изобретению может указывать одно или несколько из следующего у пациента (например, в пораженной ткани, такой как опухолевая ткань у пациента):

- (1) уменьшение уровня или активности TGF- β ;
- (2) увеличение уровней MIP2 и/или KC/GRO;
- (3) активация или инфильтрация в опухолевую ткань CD8⁺ Т-клеток, таких как I NF- γ -положительные CD8⁺ Т-клетки; и
- (4) увеличение образования скоплений естественных клеток-киллеров (NK).

A. Неонкологические болезненные состояния.

Состояния, которые можно лечить с помощью Ab1 и родственных антител, могут включать без ограничения дефекты костей (например, несовершенный остеогенез), гломерулонефрит, рубцевание нервной ткани или дермы, пневмофиброз или легочный фиброз (например, идиопатический легочный фиброз), радиационно-индуцированный фиброз, фиброз печени, миелофиброз, склеродермию, иммуноопосредованные заболевания (в том числе ревматоидный артрит, рассеянный склероз, системную красную волчанку, синдром Шегрена, болезнь Бергера и отторжение трансплантата) и контрактуру Дюпюитрена.

Они также могут быть применимы для лечения, предупреждения и снижения риска возникновения почечной недостаточности, в том числе без ограничения фокально-сегментарного гломерулосклероза (FSGS), диабетической (I типа и II типа) нефропатии, радиационной нефропатии, обструктивной нефропатии, диффузного системного склероза, наследственного заболевания почек (например, поликистозной болезни почек, медуллярной губчатой почки, подковообразной почки), гломерулонефрита, нефросклероза, нефрокальциноза, системной или гломерулярной гипертензии, тубулоинтерстициальной нефропатии, почечного тубулярного ацидоза, туберкулеза почки и инфаркта почки. В частности, они применимы в комбинации с антагонистами ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, в том числе без ограничения: ингибиторами ренина, ингибиторами ангиотензин-превращающего фермента (ACE), антагонистами рецепторов Ang II (также известными как "блокаторы рецепторов Ang II") и антагонистами альдостерона. См., например, WO 2004/098637, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Ab1 и родственные антитела применимы для лечения заболеваний и состояний, ассоциированных с отложением ЕСМ, таких как системный склероз, послеоперационные спайки, келоидные и гипертрофические рубцы, пролиферативная витреоретинопатия, операция дренирования при глаукоме, повреждение роговицы, катаракта, болезнь Пейрони, респираторный дистресс-синдром у взрослых, цирроз печени, рубцевание после инфаркта миокарда, рестеноз после ангиопластики, рубцевание после субарахноидаль-

ного кровоизлияния, фиброз после ламинэктомии, фиброз после восстановления сухожилий и других структур, билиарный цирроз печени (в том числе склерозирующий холангит), перикардит, плеврит, трахеостомия, проникающее повреждение CNS, синдром эозинофилии-миалгии, рестеноз сосудов, веноокклюзионная болезнь, панкреатит и псориазическая артропатия.

Ab1 и родственные антитела дополнительно применимы при состояниях, когда стимуляция повторной эпителизации является целесообразной. Такие состояния включают без ограничения кожные заболевания, такие как венозные язвы, ишемические язвы (пролежни), диабетические язвы, участки для трансплантации, донорские участки для трансплантации, ссадины и ожоги, заболевания бронхиального эпителия, такие как астма, ARDS, заболевания кишечного эпителия, такие как мукозит, ассоциированный с цитотоксическим лечением, язвы пищевода (рефлюксная болезнь), гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, язвы желудка, поражения тонкой кишки и толстой кишки (воспалительное заболевание кишечника).

Еще некоторые пути применения Ab1 и родственных антител используются при состояниях, при которых желательна пролиферация эндотелиальных клеток, например при стабилизации атеросклеротических бляшек, стимуляции заживления сосудистых анастомозов, или при состояниях, при которых желательно ингибирование пролиферации гладкомышечных клеток, таких как артериальные заболевания, рестеноз и астма.

Ab1 и родственные антитела также применимы для усиления иммунного ответа на опосредованные макрофагами инфекции, такие как инфекции, вызываемые *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium leprae*, а также простейшими *Toxoplasma gondii*, грибами *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* и *Cryptococcus neoformans*. Они также применимы для снижения иммунодепрессии, обусловленной, например, опухолями, AIDS или гранулематозными заболеваниями.

Ab1 и родственные антитела также применимы для предупреждения и/или лечения офтальмологических состояний, таких как глаукома и рубцевание после трабекулэктомии.

В. Онкологические болезненные состояния.

TGF- β регулирует несколько биологических процессов, в том числе пролиферацию клеток, эпителиально-мезенхимальный переход (EMT), ремоделирование матрикса, ангиогенез и иммунные функции. Каждый из этих процессов способствует прогрессированию опухоли. Обширная пагубная роль TGF- β у пациентов с раком для всех показаний также подтверждается повышением его уровня как в микроокружении опухоли, так и системно. См., например, Kadam et al., *Mol. Biomark. Diagn.* (2013), 4(3). Исследования показали, что в злокачественном состоянии TGF- β может индуцировать EMT, и образующийся в результате мезенхимальный фенотип приводит к увеличению интенсивности клеточной миграции и инвазии.

Ab1 и родственные антитела применимы при лечении гиперпролиферативных заболеваний, таких как формы рака, в том числе без ограничения рак кожи (например, меланома, в том числе неоперабельная или метастатическая меланома, плоскоклеточная карцинома кожи и кератоакантома), рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого), рак пищевода, рак желудка, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак печени (например, гепатоцеллюлярная карцинома), первичный рак брюшины, рак мочевого пузыря, ренальный рак или рак почки (например, почечноклеточная карцинома), уротелиальная карцинома, рак молочной железы, рак яичника, рак головы и шеи (например, плоскоклеточная карцинома головы и шеи), рак головного мозга, глиобластома, глиома, мезотелиома, лейкоз и лимфома.

В некоторых вариантах осуществления Ab1 и родственные антитела применимы при лечении форм рака у пациентов, у которых предшествующая терапия с использованием антитела к PD-1, антитела к PD-L1 или антитела к PD-L2 в качестве терапевтического средства оказалась неудачной или согласно ожиданиям будет неудачной, т.е. у пациентов, которые не отвечают или согласно ожиданиям не будут отвечать на терапию с помощью антитела к PD-1, антитела к PD-L1 или антитела к PD-L2. В некоторых вариантах осуществления Ab1 и родственные антитела применимы при лечении форм рака у пациентов, у которых произошел рецидив после предшествующей терапии с помощью антитела к PD-1, антитела к PD-L1 или антитела к PD-L2. Используемый в данном документе термин "согласно ожиданиям" означает, что специалист в области медицины может предвидеть, не назначая терапию, будет ли пациент отвечать или не будет отвечать и будет ли терапия неудачной или неэффективной, на основании его/ее общемедицинских знаний и конкретного состояния пациента.

В некоторых вариантах осуществления формы рака представляют собой мезенхимальные подтипы солидных опухолей, в том числе без ограничения мезенхимальный колоректальный рак, мезенхимальный рак яичника, мезенхимальный рак легкого, мезенхимальный рак головы и мезенхимальный рак шеи. Эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) способствует клеточной миграции и инвазивным свойствам посредством подавления экспрессии генов эпителиальных клеток и усиления экспрессии генов мезенхимальных клеток. EMT является характерным признаком прогрессирования и инвазии опухоли. До четверти случаев колоректального рака и рака яичника являются мезенхимальными. Таким образом, бла-

годаря ингибированию TGF- β и его индукции EMT Ab1 или родственное антитело можно применять для лечения мезенхимальных солидных опухолей. Мезенхимальные подтипы солидных опухолей можно идентифицировать с помощью ряда генетических маркеров и патологических тестов. Маркеры включают в себя ACTA2, VIM, MGP, ZEB2 и ZWINT, которые можно выявить с помощью qRT-PCR или иммуногистохимического анализа. Такие маркеры можно использовать при отборе пациентов для монотерапии с помощью антитела к TGF- β или комбинированной терапии по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления Ab1 и родственные антитела применимы при лечении пациентов с солидными опухолями на поздней стадии.

Ab1 и родственные антитела также можно применять при лечении гемопоэтических нарушений или злокачественных новообразований, таких как множественная миелома, миелодиспластический синдром (MDS), лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома и лейкоз, а также различные формы саркомы, такие как саркома Капоши.

Ab1 и родственные антитела также могут быть применимы для ингибирования опосредованного циклоспорином прогрессирования злокачественного новообразования или рака (например, метастазирования).

Разумеется, понятно, что применительно к терапии рака "лечение" включает любое медицинское вмешательство, приводящее к замедлению темпов роста раковой опухоли, задержке прогрессирования или рецидива рака или снижению темпов метастазирования рака, а также частичной ремиссии рака с целью увеличения ожидаемой продолжительности жизни пациента.

С. Комбинированная терапия в онкологии.

Наблюдалось, что уровень инфильтрации цитотоксическими Т-клетками при раке коррелирует с благоприятным клиническим исходом (Fridman et al., Nat. Rev. Cancer. (2012), 12(4):298-306; и Galon et al., Immunity (2013), 39(1):11-26). Кроме того, уровни Т-хелперных клеток, которые содействуют цитотоксическим Т-клеткам (CD4⁺ T_{H1}), и цитокинов, которые они вырабатывают (например, IFN- γ), часто также коррелируют с положительными исходами у пациентов. В отличие от этого было показано, что присутствие Treg-клеток коррелирует с неблагоприятным прогнозом для пациента (Fridman выше).

TGF- β подавляет практически все аспекты противоопухолевого иммунного ответа. Этот цитокин способствует дифференцировке iTreg и уменьшает пролиферацию и инфильтрацию цитотоксических (CD8⁺) клеток. При ингибировании TGF- β с помощью Ab1 или родственного антитела ослабляется иммунодепрессивное микроокружение опухоли, как описано выше, что приводит к положительным исходам у пациентов с раком.

Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что посредством ослабления иммунодепрессивного микроокружения опухоли Ab1 и родственные антитела могут обеспечивать для модуляторов контрольных точек, таких как антитело к PD-1, возможность лучшей индукции иммунных ответов. В результате большее количество пациентов может получать пользу от иммунотерапии, такой как лечение с помощью антитела к PD-1, антитела к PD-L1 или антитела к PD-L2.

Вместе с терапевтическими средствами, нацеливающимися на молекулы, представляющие собой контрольные точки иммунного ответа, или без них, Ab1 и родственные антитела можно также применять в сочетании с другими видами противораковой терапии, такими как химиотерапия (например, терапия с использованием препаратов платины или таксоидов), лучевая терапия и виды терапии, нацеливающиеся на раковые антигены или онкогенные факторы.

Формы рака, которые можно лечить с помощью комбинации, включающей Ab1 или родственное антитело и ингибитор контрольных точек иммунного ответа, такой как антитело к PD-1, включают формы рака, перечисленные в вышеприведенном подразделе.

В некоторых вариантах осуществления формы рака являются невосприимчивыми к предшествующей терапии с помощью антитела к PD-1, антитела к PD-L1 или антитела к PD-L2, как, например, меланома на поздней стадии или метастатическая меланома, немелкоклеточный рак легкого, почечноклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома головы и шеи и лимфома Ходжкина. Невосприимчивыми пациентами являются пациенты, у которых заболевание прогрессирует, что подтверждается, например, рентгенологически, в течение периода 12 недель после начала лечения без каких-либо признаков ответа.

В некоторых вариантах осуществления Ab1 или родственное антитело можно применять в сочетании с другим видом противораковой терапии, таким как терапия с помощью антитела к PD-1, для лечения мезенхимальных форм рака, таких как колоректальный рак, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника, рак мочевого пузыря, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, почечноклеточная карцинома, гепатоцеллюлярная карцинома и плоскоклеточная карцинома кожи. См. также обсуждения выше.

Примерами антител к PD-1 являются ниволумаб, пембролизумаб, пидилизумаб, MEDI0608 (ранее AMP-514; см., например, WO 2012/145493 и патент США № 9205148), PDR001 (см., например, WO 2015/112900), PF-06801591 (см., например, WO 2016/092419) и BGB-A317 (см., например, WO 2015/035606). В некоторых вариантах осуществления антитела к PD-1 включают в себя антитела, раскрытые в WO 2015/112800 (такие как антитела, упоминаемые как H1M7789N, H1M7799N, H1M7800N, H2M7780N, H2M7788N, H2M7790N, H2M7791N, H2M7794N, H2M7795N, H2M7796N,

H2M7798N, H4H9019P, H4xH9034P2, H4xH9035P2, H4xH9037P2, H4xH9045P2, H4xH9048P2, H4H9057P2, H4H9068P2, H4xH9119P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4xH9135P2, H4xH9145P2, H4xH8992P, H4xH8999P и H4xH9008P в табл. 1 публикации согласно PCT, и антитела, упоминаемые как H4H7798N, H4H7795N2, H4H9008P и H4H904 8P2 в табл. 3 публикации согласно PCT). Раскрытие WO 2015/112800 включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Например, антитела, раскрытые в WO 2015/112800, и родственные антитела, в том числе антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR, последовательности V_H и V_L или последовательности тяжелой и легкой цепей, раскрытые в этой публикации согласно PCT, а также антитела и антигенсвязывающие фрагменты, связывающиеся с тем же эпитопом PD-1, что и антитела, раскрытые в этой публикации согласно PCT, можно применять в сочетании с Ab1 или родственным антителом по настоящему изобретению для лечения рака. В сходных вариантах осуществления применимое антитело к PD-1 может содержать аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей, показанные ниже соответственно как SEQ ID NO: 5 и 6; последовательности V_H и V_L из SEQ ID NO: 5 и 6 (показаны курсивом) или одна или несколько (например, все шесть) CDR из SEQ ID NO: 5 и 6 (показаны в рамках).

<i>EVQLLES</i> GGV	<i>LVQPGG</i> SLRL	SCAAS <i>GF</i> TFS	<i>NFG</i> MTWVRQA	<i>PGK</i> GLEWVSG
<i>ISGGGRD</i> T ^Y F	<i>ADSVKGR</i> FTI	<i>SRDNSK</i> NLTLY	<i>LQMNSL</i> KGED	<i>TAVYYQ</i> <i>VKW</i> G
<i>NIYFDY</i> WGQG	<i>TLVTV</i> SSAST	<i>KGPSV</i> FPLAP	<i>CSRST</i> SESTA	<i>ALGCLV</i> KDYF
<i>PEPVT</i> SVWNS	<i>GALTSG</i> VHTF	<i>PAVLQ</i> SSGLY	<i>SLSSV</i> TVTPS	<i>SSLGT</i> KTYTC
<i>NVDHK</i> PSNTK	<i>VDKRVE</i> SKYG	<i>PPCPP</i> CPAPE	<i>FLGGP</i> SVFLF	<i>PPKPK</i> DTLMI
<i>SRTPE</i> VTCTV	<i>VDVSQ</i> EDPEV	<i>QFNWY</i> VDGVE	<i>VHNAK</i> TKPRE	<i>EQFN</i> STYRVV
<i>SVLTV</i> LHQDW	<i>LNGKEY</i> KCKV	<i>SNKGL</i> PSSIE	<i>KTISK</i> AKGQP	<i>REPQV</i> YTLPP
<i>SQEEM</i> TKNQV	<i>SLTCL</i> VKGFY	<i>PSDIA</i> VEWES	<i>NGQPEN</i> NYKT	<i>TPPVL</i> DSGGS
FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK (SEQ ID NO:5)				
<i>DIQMT</i> QSPSS	<i>LSASV</i> GDSIT	<i>ITCRAS</i> <i>LS</i> IN	<i>TF</i> <i>LNWY</i> QQKP	<i>GKAPN</i> LLIYA
<i>AS</i> <i>SLHGG</i> VPS	<i>RFSGS</i> SGTD	<i>FTLTIR</i> TLQP	<i>EDFAT</i> YYQ <i>Q</i> Q	<i>SSNTP</i> FTFGP
<i>GTVD</i> FRRTV	<i>AAPSV</i> FIFPP	<i>SDEQL</i> KSGTA	<i>SVVCL</i> LNNFY	<i>PREAKV</i> QWKV
<i>DNALQ</i> SGNSQ	<i>ESVTE</i> QDSKD	<i>STYSL</i> SSTLT	<i>LSKADY</i> EKKH	<i>VYACEV</i> THQG
LSSPVTKSFN RGE (SEQ ID NO:6)				

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению, такие как антитела к PD-1, не имеют С-концевого лизина в тяжелой цепи. С-концевой лизин может быть удален во время изготовления или с помощью рекомбинантной технологии (т.е. последовательность, кодирующая тяжелую цепь, не содержит кодон для С-концевого лизина). Таким образом, в рамках настоящего изобретения также рассматриваются антитела, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 5 без С-концевого лизина.

В некоторых вариантах осуществления антитело к TGF- β или его фрагмент по настоящему изобретению также можно применять в сочетании с антителом к иммуномодулирующему антигену, такому как PD-L1 и CTLA-4. Иллюстративными антителами к PD-L1 являются атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, LY330054 и BMS-936559. Иллюстративными антителами к CTLA-4 являются ипилимумаб или тремелиумаб.

D. Биомаркеры эффективности лечения.

Эффективность Ab1 и родственных антител можно определить с помощью биомаркеров или по занятости мишени. Например, в опухолевых тканях занятость мишени можно проанализировать путем оценивания уровней активного TGF- β в биоптатах с использованием анализа Meso Scale Discovery (MSD). В крови связывание с мишенью можно проанализировать путем оценивания эффекта уменьшенного уровня циркулирующего TGF- β в отношении мононуклеарных клеток периферической крови, таких как лимфоциты (Т-клетки, В-клетки, NK-клетки) и моноциты. Например, увеличенную пролиферацию циркулирующих $CD8^+$ Т-клеток можно оценить с использованием $CD45^+RO^+CCR7^+CD28^+Ki67^+$ в качестве маркеров в проточной цитометрии. Активацию циркулирующих NK-клеток можно оценить с использованием $cD3^+CD56^{высокая/тусклая}CD16^+$ или $CD137^+$ в качестве маркеров в проточной цитометрии. Дополнительно Ki-67, PD-1 и ICOS можно применять в качестве PD-маркеров, ассоциированных с активацией Т-клеток.

Иммунную модуляцию при лечении с помощью Ab1 или родственного антитела можно проанализировать путем оценивания изменений инфильтрирующих иммунных клеток и иммунных маркеров с помощью мультиплексных иммуногистохимических анализов (ИHC) с использованием, например, платформы NeoGenomics. В частности, с помощью панели MultiOmyx TIL от NeoGenomics производят окрашивание для выявления панели иммунных маркеров, что обеспечивает возможность количественного определения плотности и локализации различных иммунных клеток. Иммунные маркеры могут указывать на дифференцировку iTreg; инфильтрацию и пролиферацию $CD8^+$ Т-клеток и выработку IFN- γ $CD8^+$

Т-клетками. Было показано, что Ab1 ингибирует дифференцировку $CD4^+$ Т-клеток в iTreg (см., например, пример 3 ниже) и увеличивает пролиферацию $CD8^+$ Т-клеток и образование ими IFN- γ (как показано в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов; данные не показаны). Таким образом, на эффективность лечения с помощью Ab1 или родственного антитела может указывать ингибирование iTreg, индукция пролиферации $CD8^+$ Т-клеток и их инфильтрации в опухоль или другие пораженные ткани, увеличенная выработка IFN- γ и/или увеличенное соотношение $CD8^+$ Т-клеток и Treg-клеток. Иммунную модуляцию при лечении с помощью Ab1 или родственного антитела также можно анализировать в периферической крови с помощью количественного подсчета иммунных клеток с использованием метилчувствительной ПЦР для $CD8^+$ Т-клеток, Treg-клеток, NK-клеток и других иммунных клеток. Эффективность лечения может проявляться клинически в виде задержки или обращения вспять прогрессирования заболевания, такого как прогрессирование опухоли.

II. Способы получения антител.

Ab1 и родственные антитела, а также антитела, нацеливающиеся на другие совместные мишени, такие как PD-1, PD-L1 или PD-L2, можно получить с помощью способов, хорошо известных из уровня техники. Последовательности ДНК, кодирующие тяжелые и легкие цепи антител, можно вставить в векторы экспрессии таким образом, чтобы гены были функционально связаны с необходимыми последовательностями для контроля экспрессии, такими как последовательности для контроля транскрипции и трансляции. Векторы экспрессии включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирус табачной мозаики, космиды, YAC, эписомы, полученные из EBV и т.п. Последовательность, кодирующая легкую цепь антитела, и последовательность, кодирующая тяжелую цепь антитела, могут быть вставлены в отдельные векторы и могут быть функционально связаны с одинаковыми или разными последовательностями для контроля экспрессии (например, промоторами). В одном варианте осуществления обе кодирующие последовательности вставлены в один и тот же вектор экспрессии и могут быть функционально связаны с одной и той же последовательностью для контроля экспрессии (например, общим промотором) с отдельными идентичными последовательностями для контроля экспрессии (например, промоторами) или с разными последовательностями для контроля экспрессии (например, промоторами). Последовательности, кодирующие антитела, можно вставлять в вектор экспрессии стандартными способами (например, путем лигирования по комплементарным сайтам рестрикции во фрагменте гена антитела и векторе или лигирования по "тупым концам", если сайты рестрикции отсутствуют).

В дополнение к генам цепей антител, рекомбинантные векторы экспрессии могут нести регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепей антител в клетке-хозяине. Примеры регуляторных последовательностей для экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих включают вирусные элементы, которые управляют высокими уровнями экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, полученные из LTR ретровирусов, цитомегаловируса (CMV) (такой как промотор/энхансер CMV), вируса обезьян 40 (SV40) (такой как промотор/энхансер SV40), аденовируса (например, главный поздний промотор аденовируса (AdMLP)), вируса полиомы, а также сильные промоторы млекопитающих, такие как нативные промоторы генов иммуноглобулинов и актина.

В дополнение к генам цепей антител и регуляторным последовательностям рекомбинантные векторы экспрессии по настоящему изобретению могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации), и селективируемые маркерные гены. Например, селективируемый маркерный ген придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую был введен вектор. Селективируемые маркерные гены могут включать в себя ген дигидрофолат-редуктазы (DHFR) (для применения в dhfr-клетках-хозяевах при отборе/амплификации под действием метотрексата), ген пео (для отбора под действием G418) и ген глутаматсинтетазы.

Векторы экспрессии, кодирующие антитела по настоящему изобретению, вводят в клетки-хозяева для экспрессии. Клетки-хозяева культивируют в условиях, подходящих для экспрессии антитела, которое затем собирают и выделяют. Клетки-хозяева включают в себя клетки-хозяева млекопитающих, растений, бактерий или дрожжей. Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны из уровня техники и включают в себя множество иммортализованных линий клеток, доступных из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Они включают в себя, помимо прочего, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки NS0, клетки SP2, клетки HEK-293T, клетки 293 Freestyle (Invitrogen), клетки NIH-3T3, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки почки африканской зеленой мартышки (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549 и ряд других линий клеток. Линии клеток могут быть выбраны на основании их уровней экспрессии. Другими линиями клеток, которые можно применять, являются линии клеток насекомых, такие как клетки Sf9 или Sf21.

Дополнительно экспрессию антител можно усилить с помощью ряда известных методик. Например, система экспрессии гена глутаминсинтетазы (система GS) является общепринятым подходом для усиления

ния экспрессии в определенных условиях.

Среда для культивирования тканей для клеток-хозяев может содержать или не содержать компоненты животного происхождения (ADC), такие как бычий сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления для безопасности человека предпочтительны культуральные среды без ADC. Культивирование ткани можно выполнять с использованием способа периодического культивирования с подпиткой, способа непрерывной перфузии или любого другого способа, подходящего для клеток-хозяев и желаемого урожая.

III. Фармацевтические композиции.

Антитело по настоящему изобретению можно составлять для обеспечения подходящей стабильности при хранении. Например, антитело можно лиофилизировать, или хранить, или разбавлять для применения с помощью фармацевтически приемлемых наполнителей. Для комбинированной терапии два или более терапевтических средства, таких как антитела, можно составлять совместно, например смешивать и предоставлять в одной композиции.

Термин "наполнитель" или "носитель" используется в данном документе для описания любого ингредиента, отличного от соединения(соединений) по настоящему изобретению. Выбор наполнителя(ей) будет в значительной степени зависеть от таких факторов, как конкретный способ введения, эффект наполнителя в отношении растворимости и стабильности и природа лекарственной формы. "Фармацевтически приемлемый наполнитель" включает любые возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие всасывание средства и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Некоторыми примерами фармацевтически приемлемых наполнителей являются вода, солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, декстроза, глицерин, этанол и т.п., а также их комбинации. В некоторых случаях в композицию будут включены изотонические средства, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Дополнительными примерами фармацевтически приемлемых веществ являются смачивающие средства или незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, консерванты или буферы, которые повышают сохраняемость или эффективность антитела.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно получать, упаковывать или реализовывать в нерасфасованном виде, в виде единичной стандартной дозы и/или в виде множества единичных стандартных доз. Как используется в данном документе, "стандартная доза" представляет собой дискретное количество фармацевтической композиции, содержащее предварительно определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозе активного ингредиента, которую вводят субъекту, или удобной доле такой дозы, такой как, например, половина или одна треть такой дозы.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению обычно подходят для парентерального введения. Как используется в данном документе, "парентеральное введение" фармацевтической композиции включает любой путь введения, характеризующийся физическим разрыванием ткани субъекта и введением фармацевтической композиции через разрыв в ткани, что, как правило, приводит к прямому введению в кровоток, в мышцу или во внутренний орган. Парентеральное введение, таким образом, включает без ограничения введение фармацевтической композиции путем инъекции композиции, путем внесения композиции через хирургический разрез, путем внесения композиции через проникающую неоперационную рану ткани и т.п. В частности, предполагается, что парентеральное введение включает без ограничения подкожную, внутрибрюшинную, внутримышечную, внутригрудинную, внутривенную, внутриартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, интрауретральную, внутричерепную, внутриопухолевую и внутрисуставную инъекцию или инфузию; а также методики диализной инфузии в почки. Также рассматривается регионарная перфузия. Предпочтительные варианты осуществления могут включать внутривенные и подкожные пути.

Составы на основе фармацевтической композиции, подходящие для парентерального введения, обычно содержат активный ингредиент в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, таким как стерильная вода или стерильный изотонический солевой раствор. Такие составы можно получать, упаковывать или реализовывать в форме, подходящей для болюсного введения или для непрерывного введения. Инъекционные составы можно получать, упаковывать или реализовывать в стандартной лекарственной форме, такой как ампулы или многодозовые контейнеры, содержащие консервант. Составы для парентерального введения включают без ограничения суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных средах-носителях, пасты и т.п. Такие составы могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, в том числе без ограничения суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие средства. В одном варианте осуществления состава для парентерального введения активный ингредиент предоставлен в сухой (т.е. порошкообразной или гранулированной) форме для разбавления подходящей средой-носителем (например, стерильной апиrogenной водой) перед парентеральным введением разбавленной композиции. Составы для парентерального введения также включают водные растворы, которые могут содержать наполнители, такие как соли, углеводы и буферные средства (например, с pH от 3 до 9), но для некоторых путей применения их можно более подходящим образом

составлять в виде стерильного неводного раствора или в виде высушенной формы для применения в сочетании с подходящей средой-носителем, такой как стерильная апиrogenная вода. Иллюстративные формы для парентерального введения включают растворы или суспензии в стерильных водных растворах, например, водных растворах пропиленгликоля или декстрозы. Такие лекарственные формы можно подходящим образом буферизировать в случае необходимости. Другие составы для парентерального введения, которые являются применимыми, включают составы, которые содержат активный ингредиент в микрокристаллической форме или в виде липосомального препарата. Составы для парентерального введения можно составлять для немедленного и/или модифицированного высвобождения. Составы с модифицированным высвобождением включают составы с отсроченным, замедленным, прерывистым, контролируемым, целенаправленным и запрограммированным высвобождением.

IV. Иллюстративные варианты осуществления.

Дополнительные конкретные варианты осуществления настоящего изобретения описываются следующим образом.

1. Выделенное моноклональное антитело, которое специфично связывается с TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3 человека, содержащее области, определяющие комплементарность (CDR), 1-3 тяжелой цепи из SEQ ID NO: 1 и CDR1-3 легкой цепи из SEQ ID NO: 2, где антитело содержит константную область IgG₄ человека, содержащую пролин в положении 228 (нумерация по EU).

2. Антитело согласно варианту осуществления 1, где антитело содержит аминокислотную последовательность вариabельного домена тяжелой цепи (V_H), соответствующую остаткам 1-120 в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность вариabельного домена легкой цепи (V_L), соответствующую остаткам 1-108 в SEQ ID NO: 2.

3. Антитело согласно варианту осуществления 2, где антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 1 (с С-концевым лизином или без него), и аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 2.

4. Антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно варианту осуществления 3, где фрагмент представляет собой $F(ab')_2$.

5. Антитело или его фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-4, где антитело или его фрагмент характеризуются увеличенным периодом полужизни или увеличенным воздействием по сравнению с фрезолимумабом.

6. Антитело или его фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-5, где антитело или его фрагмент характеризуются одним или несколькими из следующих свойств:

- а) ингибируют дифференцировку CD4⁺ Т-клеток в индуцируемые регуляторные Т-клетки (iTreg);
- б) увеличивают пролиферацию CD8⁺ Т-клеток;
- с) увеличивают образование скоплений естественных клеток-киллеров (NK);
- д) увеличивают уровень MIP-2; и
- е) увеличивают уровень KC/GRO.

7. Композиция, содержащая антитело или его фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-6, где композиция содержит менее 1% полуантител.

8. Антитело или его фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-6 в качестве лекарственного препарата.

9. Способ ингибирования передачи сигнала от TGF- β у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтического количества антитела или его фрагмента согласно любому из вариантов осуществления 1-6.

10. Способ согласно варианту осуществления 9, где пациент имеет рак.

11. Способ согласно варианту осуществления 10, где рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легкого, плоскоклеточной карциномы кожи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, уротелиального рака и почечноклеточной карциномы.

12. Способ согласно вариантам осуществления 10 или 11, где рак характеризуется сверхэкспрессией одного или нескольких из ACTA2, VIM, MGP и ZWINT.

13. Способ согласно любому из вариантов осуществления 10-12, где рак представляет собой мезенхимальную опухоль.

14. Способ согласно любому из вариантов осуществления 10-13, где антитело или его фрагмент ослабляют иммунодепрессивное микроокружение опухоли.

15. Способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту (1) антитела или его фрагмента согласно любому из вариантов осуществления 1-6 и (2) ингибитора белка, представляющего собой контрольную точку иммунного ответа.

16. Способ согласно варианту осуществления 15, где белок, представляющий собой контрольную точку иммунного ответа, представляет собой PD-1, PD-L1 или PD-L2.

17. Способ согласно варианту осуществления 16, где ингибитор белка, представляющего собой контрольную точку иммунного ответа, представляет собой антитело к PD-1.

18. Способ согласно варианту осуществления 17, где антитело к PD-1 содержит CDR1-3 тяжелой цепи из SEQ ID NO: 5 и CDR1-3 легкой цепи из SEQ ID NO: 6.

19. Способ согласно варианту осуществления 17, где антитело к PD-1 содержит аминокислотную последовательность V_H , соответствующую остаткам 1-117 в SEQ ID NO: 5, и аминокислотную последовательность V_L , соответствующую остаткам 1-107 в SEQ ID NO: 6.

20. Способ согласно варианту осуществления 17, где антитело к PD-1 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 5 (с С-концевым лизином или без него), и аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 6.

21. Способ согласно любому из вариантов осуществления 15-20, где антитело к TGF- β содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 1 (с С-концевым лизином или без него), и аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 2.

22. Способ согласно любому из вариантов осуществления 15-21, где рак является невосприимчивым к лечению с помощью антитела к PD-1.

23. Способ согласно любому из вариантов осуществления 15-22, где рак представляет собой меланому на поздней стадии или метастатическую меланому или плоскоклеточную карциному кожи.

24. Способ согласно любому из вариантов осуществления 15-23, где рак представляет собой мезенхимальный подтип солидной опухоли.

25. Способ согласно любому из вариантов осуществления 15-24, где рак характеризуется сверхэкспрессией одного или нескольких из ACTA2, VIM, MGP и ZWINT.

26. Способ согласно любому из вариантов осуществления 15-25, где рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легкого, плоскоклеточной карциномы кожи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, уротелиального рака и почечноклеточной карциномы.

27. Способ согласно любому из вариантов осуществления 15-26, где антитело или его фрагмент ослабляют иммунодепрессивное микроокружение опухоли.

28. Способ согласно любому из вариантов осуществления 15-27, где антитело к TGF- β и антитело к PD-1 вводят пациенту в один и тот же день.

29. Способ согласно любому из вариантов осуществления 15-28, где антитело к TGF- β и антитело к PD-1 вводят пациенту раз в две недели.

30. Способ согласно любому из вариантов осуществления 15-29, где антитело к TGF- β и антитело к PD-1 вводят соответственно в дозе 0,05-20 мг/кг массы тела.

31. Способ увеличения интенсивности иммунного ответа у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту ингибитора контрольных точек иммунного ответа и антитела или его фрагмента согласно любому из вариантов осуществления 1-6.

32. Способ согласно варианту осуществления 31, где ингибитор контрольных точек представляет собой антитело к PD-1.

33. Способ согласно варианту осуществления 32, где антитело к PD-1 содержит

a) HCDR1-3 из SEQ ID NO: 5 и LCDR1-3 из SEQ ID NO: 6;

b) V_H и V_L , соответствующие остаткам 1-117 в SEQ ID NO: 5 и остаткам 1-107 в SEQ ID NO: 6 соответственно; или

c) тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 5 (с С-концевым лизином или без него), и легкую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 6.

34. Способ согласно любому из вариантов осуществления 31-33, где антитело к TGF- β содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 1 (с С-концевым лизином или без него), и аминокислотную последовательность легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 2.

35. Способ согласно любому из вариантов осуществления 31-34, где пациент имеет рак.

36. Способ согласно варианту осуществления 35, где пациент является невосприимчивым к существующему лечению с помощью ингибитора контрольных точек иммунного ответа и/или имеет солидную опухоль мезенхимального подтипа.

37. Способ согласно вариантам осуществления 35 или 36, где рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легкого, плоскоклеточной карциномы кожи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, уротелиального рака и почечноклеточной карциномы.

38. Способ согласно любому из вариантов осуществления 35-37, где рак характеризуется сверхэкспрессией одного или нескольких из ACTA2, VIM, MGP и ZWINT.

39. Способ согласно любому из вариантов осуществления 35-38, где антитело или его фрагмент ослабляют иммунодепрессивное микроокружение опухоли.

40. Антитело или его фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-6 для применения в

лечении пациента с помощью любого из вышеуказанных способов.

41. Применение антитела или его фрагмента согласно любому из вариантов осуществления 1-6 для изготовления лекарственного препарата, предназначенного для лечения пациента с помощью любого из вышеуказанных способов.

42. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь, легкую цепь или их обе у антитела или его фрагмента согласно любому из вариантов осуществления 1-6.

43. Вектор экспрессии, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 42.

44. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии согласно варианту осуществления 43.

45. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из вариантов осуществления 1-6, при этом способ включает

получение клетки-хозяина, содержащей первую и вторую нуклеотидные последовательности, кодирующие соответственно тяжелую цепь и легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, выращивание клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих выработку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и

выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

46. Способ получения фармацевтической композиции, включающий получение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из вариантов осуществления 1-6; и

смешивание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым наполнителем.

47. Изделие или набор, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вариантов осуществления 1-6 и другое терапевтическое средство.

48. Изделие или набор согласно варианту осуществления 47, где другое терапевтическое средство представляет собой ингибитор контрольных точек иммунного ответа, описанный в данном документе.

Настоящее изобретение дополнительно описывается в следующих примерах, которые не ограничивают объем настоящего изобретения, описанный в формуле изобретения.

Примеры

Для лучшего понимания настоящего изобретения приведены следующие примеры. Эти примеры приведены только для иллюстрации и никоим образом не должны истолковываться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Пример 1. Свойства связывания с TGF- β у Ab1.

Аффинность Ab1 ко всем изоформам TGF- β человека и мыши определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biosensor Biacore T200 (GE Healthcare) с использованием чипа серии S, покрытого карбоксиметилированным декстраном (CM5). Ab1 в серии концентраций (1, 11, 33, 10 и 30 нМ) вводили на иммобилизованный рекомбинантный TGF- β для измерения связывающего взаимодействия в реальном времени. Гомодимеры TGF- β иммобилизовали при низкой плотности, чтобы уменьшить эффекты avidности. Введения проводили в трех повторностях и анализ связывания повторяли три раза. Данные кинетических экспериментов обрабатывали с использованием программного обеспечения Biacore T200 BIAevaluation v2.0. Полученные сенсограммы интерполировали до нуля, выравнивали, дважды сравнивали с эталоном и обрезали для анализа с подбором кривой с использованием модели связывания 1:1 для определения константы скорости ассоциации (k_a), константы скорости диссоциации (k_d) и равновесной константы диссоциации (K_D).

Рекомбинантные белки получали своими силами (TGF- β 1, 2 и 3 человека) либо приобретали в R&D Systems (TGF- β 1 и 2 мыши). В приведенной ниже табл. 1 показана гомология аминокислотных последовательностей трех активных изоформ TGF- β между макаками-резусами, мышами или крысами и людьми (гомология указана как процентная доля консервативных аминокислот по отношению к общему количеству аминокислот).

Таблица 1

	Гомология активных изоформ TGF- β по отношению к человеческим		
	Процент гомологии		
	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
Макак-резус	100% (112/112)	100% (112/112)	100% (112/112)
Мышь	99,1% (111/112) *	97% (109/112) *	100% (112/112)
Крыса	99,1% (111/112) *	97% (109/112) *	99,1% (111/112)

* TGF β 1 крысы и мыши на 100% гомологичны друг другу; и

TGF β 2 крысы и мыши на 100% гомологичны друг другу.

Поскольку TGF- β 3 человека и TGF- β 3 мыши идентичны по аминокислотной последовательности, отдельные измерения аффинности для этих двух белков не производились. Аналогично TGF- β 1 и 2 мыши и крысы идентичны по аминокислотной последовательности, и отдельные измерения аффинности также не производились.

Значения k_a , k_d и K_D для Ab1, определенные вышеуказанным способом, представлены в табл. 2 ниже. Значения K_D Ab1 для TGF- β 1, 2 и 3 человека определили как составляющие соответственно 1,48, 3,00 и 1,65 нМ. Значения K_D Ab1 для TGF- β 1 и 2 мыши/крысы определили как составляющие соответственно 2,80 и 1,88 нМ. Эти свойства связывания аналогичны свойствам фрезолимуаба.

Таблица 2

	Константы равновесия и аффинность Ab1 в отношении TGF- β				
	Человека		Мыши и крысы		Человека
					и мыши
	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
k_a ($\times 10^5 M^{-1} s^{-1}$)	3,11 $\pm$	2,86 $\pm$	2,98 $\pm$	3,48 $\pm$	2,23 $\pm$
	0,3	0,3	0,07	0,24	0,6
k_d ($\times 10^{-4} s^{-1}$)	3,43 $\pm$	8,23 $\pm$	8,35 $\pm$	6,45 $\pm$	3,72 $\pm$
	2,9	5,0	0,38	1,44	2,3
K_D (нМ)	1,48 $\pm$	3,00 $\pm$	2,80 $\pm$	1,88 $\pm$	1,65 $\pm$
	1,1	2,0	0,08	0,56	1,1

Приведенные выше данные демонстрируют, что Ab1 является действенным и избирательным пан-специфичным ингибитором TGF- β . Измерения с использованием поверхностного плазмонного резонанса демонстрируют, что Ab1 характеризуется аффинностью от 1 до 5 нМ для всех изоформ TGF- β человека и мыши. Высокий уровень специфичности подтвердили в исследованиях тканевой перекрестной реактивности с помощью иммуногистохимического анализа (ИHC) в соответствии с GLP с использованием нормальных тканей крысы, макака-крабоеда и человека.

Пример 2. Действенность нейтрализации TGF β у Ab1.

Действенность Ab1 *in vitro* в отношении активности нейтрализации TGF- β измеряли в клеточном анализе. В этом анализе измеряли способность TGF- β ингибировать пролиферацию нетрансформированных эпителиальных клеток легкого норки (клеток Mv 1 Lu). См., например, WO 2006/086469 и Mazzieri et al., Eds, "Methods in Molecular Biology", vol. 142, "Transforming Growth Factor- β Protocols". Оценивали способность Ab1, фрезолимуаба и 1D11 (антитела мыши к TGF- β , последовательности тяжелой и легкой цепей которого раскрыты в данном документе под SEQ ID NO: 9 и 10) к нейтрализации TGF- β 1, 2, 3 человека и TGF- β 1 и 2 мыши. Рекомбинантные белки TGF- β получали своими силами (TGF- β 1, 2 и 3 человека) либо приобретали в R&D Systems (TGF- β 1 и 2 мыши).

Все изоформы TGF- β человека и мыши ингибировали пролиферацию клеток легкого норки дозозависимым образом в диапазоне от 0,02 пг/мл до 10 нг/мл. Для количественной оценки действенности Ab1, фрезолимуаба и 1D11 1 нг/мл указанного TGF- β и антитела в серийном разведении инкубировали с клетками легкого норки. Спустя три дня инкубирования количественно оценивали пролиферацию клеток с помощью красителя CyQUANT, который флуоресцирует при связывании с ДНК (фиг. 1A-1E). Данные демонстрируют, что Ab1, фрезолимуаб и их имитатор 1D11 мыши ингибировали все изоформы TGF- β человека и мыши в сходной степени.

Пример 3. Ингибирование дифференцировки в индуцируемые регуляторные Т-клетки с помощью Ab1.

Регуляторные Т-клетки (Treg) являются иммунодепрессивными, и их уровни коррелируют с отрицательными исходами у пациентов с раком. В исследовании, описанном ниже, авторы настоящего изобретения изучали, может ли Ab1 ингибировать индуцированную TGF- β дифференцировку CD4⁺ Т-клеток человека в индуцируемые регуляторные Т-клетки (iTreg). Первичные CD4⁺ Т-клетки человека выделяли у здоровых нормальных доноров. TGF- β 1 человека приобретали в R&D Systems.

Для изучения антагонистической активности Ab1 в отношении TGF- β , эндогенно вырабатываемого культивируемыми клетками, общую популяцию CD4⁺ Т-клеток без добавления экзогенного TGF- β обрабатывали с помощью 50 мкг/мл изотипического контроля (антитела IgG4-каппа человека к лизоциму белка куриных яиц (HEL), Crown Bioscience), Ab1 или фрезолимуаба в присутствии или в отсутствие стимуляции (с помощью антитела к CD3, антитела к CD28 и IL-2) в течение 6 дней с последующим анализом методом проточной цитометрии. Среднее процентное содержание и стандартное отклонение для популяции CD25⁺FOXP3⁺ рассчитывали в исходной популяции (лимфоциты/живые/одиночные клетки/CD4⁺CD127⁺) в трех повторностях. При стимуляции общей популяции CD4⁺ Т-клеток человека с помощью антитела к CD3, антитела к CD28 и IL-2 процентное содержание FOXP3⁺CD25⁺ (iTreg) в куль-

туре увеличивалось с 0 до 15%. При обработке с помощью 50 мкг/мл Ab1 или 50 мкг/мл фрезолимумаба процентное содержание iTreg уменьшалось в сходной степени (до 8 и 7% соответственно; фиг. 2). В отличие от этого обработка с помощью IgG₄ человека (hIgG₄) в качестве изотипического контроля производила минимальный эффект в отношении дифференцировки iTreg (20% iTreg) (фиг. 2). CD4⁺ Т-клетки, выделенные у второго здорового нормального добровольца, давали аналогичные результаты.

Для изучения антагонистической активности Ab1 в отношении экзогенного TGF-β общую популяцию CD4⁺ Т-клеток, инкубированных с 2 нг/мл TGF-β1 человека, обрабатывали с помощью изотипического контроля, Ab1 или фрезолимумаба при различных концентрациях антител в присутствии или в отсутствие стимуляции (с помощью антитела к CD3, антитела к CD28 и IL-2) в течение 6 дней с последующим анализом методом проточной цитометрии. Среднее процентное содержание и стандартное отклонение для популяции CD2⁺FOXP3⁺ рассчитывали в исходной популяции (лимфоциты/живые/одиночные клетки/CD4⁺CD127⁺) в трех повторностях за исключением отмеченных случаев. При добавлении экзогенного TGF-β1 (2 нг/мл) к стимулированной общей популяции CD4⁺ Т-клеток процентное содержание iTreg в культуре увеличивалось с 15 до 55%. При обработке с помощью Ab1 в возрастающих концентрациях процентное содержание iTreg уменьшалось параллельно с 55 до 15% при 200 мкг/мл и до 43% при 6,25 мкг/мл. При обработке фрезолимумабом процентное содержание iTreg уменьшалось в той же степени, что и в случае с Ab1 (с 55 до 16% при 200 мкг/мл и до 32% при 6,25 мкг/мл). Обработка с помощью антитела изотипического контроля в различных концентрациях не производила эффект в отношении процентного содержания iTreg: 60% при 200 и 6,25 мкг/мл. См. фиг. 3. CD4⁺ Т-клетки, выделенные у второго здорового нормального добровольца, давали аналогичные результаты.

Это исследование демонстрирует, что Ab1 ингибирует дифференцировку iTreg, индуцированную TGF-β, и таким образом может приносить клиническую пользу, ослабляя иммунодепрессивное микроокружение опухоли.

Пример 4. Эффекты комбинации антитела Ab1 и антитела к PD-1 *in vitro*.

В этом исследовании авторы настоящего изобретения изучали, может ли TGF-β предотвращать максимальную стимуляцию Т-клеток *in vitro* после обработки с помощью антитела к PD-1, и если да, то может ли Ab1 противодействовать этому предотвращению. Экспрессию люциферазы из экспрессионной конструкции под транскрипционным контролем регуляторных последовательностей NFATc (цитоплазматического ядерного фактора активированных Т-клеток 1) использовали для измерения уровня активации Т-клеток.

Для этого исследования авторы настоящего изобретения использовали систему для клеточного анализа, приобретенную в Promega. Эта система содержит два типа клеток:

1) Т-клетки Jurkat, экспрессирующие PD-1 человека и репортерный ген люциферазы под управлением элемента ответа на NFAT; и

2) клетки CHO-K1, экспрессирующие PD-L1 человека и сконструированный белок клеточной поверхности, предназначенный для активации когнатного Т-клеточного рецептора антигеннезависимым образом.

После совместного культивирования Т-клетки Jurkat взаимодействуют с клетками CHO-K1, вызывая стимуляцию Т-клеточных рецепторов и транслокацию NFATc в ядро, где он управляет экспрессией люциферазы. Однако при вовлечении PD-1/PD-L1 (SHP2) к Т-клеточному рецепторному комплексу привлекается нерецепторная тирозинпротеинфосфатаза 11 типа, что ингибирует ядерную транслокацию NFATc и последующую экспрессию люциферазы. Блокирование передачи сигнала от PD-1 ослабляет SHP2-зависимое подавление и, таким образом, обеспечивает возможность максимальной экспрессии люциферазы. Таким образом, данная система обеспечивает функциональный способ для определения эффекта TGF-β в отношении передачи сигнала в Т-клетках и влияния Ab1 на обработку Т-клеток с помощью антитела к PD-1.

Ввиду низких кинетических параметров, связанных с TGF-β-зависимыми эффектами, Т-клетки Jurkat предварительно обрабатывали с помощью TGF-β перед стимуляцией Т-клеточных рецепторов. TGF-β1 человека приобретали в R&D Systems. Антитело изотипического контроля для Ab1 (антитело hIgG₄ к HEL) приобретали в Crown Bioscience (№ по кат. C0004-5). Антитело IgG мыши к hPD-1 и соответствующее ему антитело изотипического контроля приобретали в BioLegend (№ по кат. 329912). В каждом образце анализировали четырнадцать повторностей.

Результаты показали, что при добавлении антитела к hPD-1 к Т-клеткам Jurkat, совместно культивируемым с клетками CHO-K1 в течение 24 ч, люциферазная активность (865794 относительных единиц люминесценции [RLU]) индуцировалась в большей степени, чем при добавлении изотипического контроля (234963 RLU, кратность изменения=3,685, р-значение <0,0001) или просто в отсутствие антитела (206043 RLU, кратность изменения=4,202, р-значение <0,0001). При предварительной обработке Т-клеток Jurkat с помощью 18 нг/мл TGF-β1 в течение 12 дней индуцировалась меньшая люциферазная активность (638866 RLU) в совместной культуре с клетками CHO-K1 в присутствии антитела к hPD-1 по сравнению с Т-клетками Jurkat, не обработанными с помощью TGF-β1 (865794 RLU, кратность измене-

ния=-1,355, р-значение <0,0001) (фиг. 4).

Чтобы оценить антагонистическую действенность Ab1, Т-клетки Jurkat предварительно обрабатывали с помощью 18 нг/мл TGF-β1 в присутствии Ab1, Ab изотипического контроля или без Ab в течение 12 дней, а затем совместно культивировали с клетками CHO-K1 в присутствии антитела к PD-1 в течение 24 ч. В присутствии Ab1 (924186 RLU) ослаблялось TGF-β-зависимое подавление люциферазной активности по сравнению с Ab изотипического контроля (639440 RLU, кратность изменения=1,445, р - значение <0,0001) и контролем без Ab (638866 RLU, кратность изменения=1,447, р - значение <0,0001). В контрольных группах с Ab1 (975654 RLU) или изотипическим контролем (955717 RLU), добавляемыми к Т-клеткам Jurkat, предварительно не обработанным TGF-β1 и совместно культивируемым с клетками CHO-K1 в совместной культуре в присутствии Ab к PD-1, наблюдалась статистически значимо повышенная люциферазная активность по сравнению с контролем без Ab, но с минимальной кратностью изменения (865794 RLU, кратность изменения=1,127 и 1,104, р - значение=0,0023 и 0,001284 соответственно) (фиг. 4). Значения RLU также представлены в табл. 3 ниже.

Таблица 3

Относительные единицы люминесценции в анализе активации Т-клеток

	Ab к PD-1		Изотипический контроль для Ab к PD-1	Среда-носитель (PBS)
	Без предварительной обработки с помощью TGF-β1	С предварительной обработкой с помощью TGF-β1		
Без Ab1	865794	638866	234963	206043
Ab1	975654	924186	—	—
Антитело hIgG ₄ к HEL	955717	639440	—	—

Чтобы исключить возможность того, что предварительная обработка Т-клеток Jurkat с помощью TGF-β1 может обуславливать уменьшение пролиферации или жизнеспособности и, следовательно, приводить к уменьшению люциферазной активности в течение 24-часового совместного культивирования с клетками CHO-K1, авторы настоящего изобретения инкубировали Т-клетки Jurkat с 18 нг/мл TGF-β1 или PBS в присутствии Ab1, антитела к hIgG₄K HEL или без антитела (со средой-носителем) в течение 7 дней. Каждые 2-3 дня равный объем из каждой группы использовали для посева в новую колбу, во время которого обновляли и TGF-β1, и антитело (всего имело место два события пересева). Оценка конечной культуры продемонстрировала, что жизнеспособность во всех группах обработки была неизменной (в диапазоне от 94 до 96%). Кроме того, общее количество Т-клеток Jurkat в конечной культуре в каждой группе обработки было весьма сходным (в диапазоне от 25 до 29 млн).

Вышеупомянутое исследование демонстрирует, что увеличение интенсивности передачи сигнала в нисходящем направлении от Т-клеточного рецептора после обработки с помощью антитела к PD-1 подавляется действием TGF-β, что приводит к неоптимальной стимуляции Т-клеток. Данные авторов настоящего изобретения позволяют предположить, что при ингибировании TGF-β ослабляется иммунодепрессивное микроокружение опухоли, а для модуляторов контрольных точек, таких как средства на основе антитела к PD-1, обеспечивается возможность лучшей индукции иммунных ответов, и, таким образом, увеличивается доля пациентов, получающих пользу от иммуноонкологического лечения.

Пример 5. Эффекты комбинации антитела Ab1 и антитела к PD-1 *in vivo*.

Затем авторы настоящего изобретения изучили эффекты комбинированного лечения с помощью антитела к TGF-β и антитела к PD-1 в модели рака на мышах C57BL/6.

Переносимость/предварительная оценка безопасности.

Материалы и способы.

Переносимость Ab1 и моноклонального антитела (mAb) к PD-1 мыши (mPD-1) в качестве монотерапии и в комбинации оценивали у самок мышей C57BL/6. Ab1 (10, 20 и 50 мг/кг) или Ab изотипического контроля (антитело hIgG₄ к HEL, приобретенное в Crown Bioscience; применяемое в дозах 10 и 20 мг/кг) вводили IV раз в три дня (Q3D) в качестве монотерапии или в комбинации с Mab к PD1 в дозе 5 мг/кг IV два раза в неделю. Ab к PD1, применяемое в данном исследовании, было обозначено как "anti-mPD1_hyb_RMP114_mIgG1LCfullrat" (или Mab x-anti-mPD-1). Оно представляло собой химерное антитело крысы к mPD-1, полученное путем замены Fc-области крысы клона RMP1-14 IgG_{2a} крысы (BioXCell, № по кат. BE0146) Fc-областью IgG₁ мыши. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей этого химерного антитела показаны под SEQ ID NO: 7 и 8. Переносимость оценивали путем измерения показателей массы тела животного и клинических наблюдений. В конце трехнедельного периода обработки через 4 ч после последней обработки проводили заключительный отбор образцов и ткани (сердце, почку, печень, легкие и селезенку) фиксировали в формальдегиде и направляли на гистопатологические анализы.

Дозу считали чрезмерно токсичной, если она вызывала 15% потерю массы тела в течение трех последовательных дней у отдельной мыши, 20% потерю массы тела в течение одного дня или 10% или более смертей, связанных с приемом лекарственного средства, за исключением случаев, когда в контрольной группе, получавшей обработку средой-носителем, наблюдалась индуцированная опухолью кахексия, приводящая к потере массы тела. Масса тела животного включала массу опухоли.

Результаты анализа токсичности/безопасности.

Исследование переносимости у мышей C57BL/6 показало, что все тестируемые уровни доз Ab1 и Mab x-anti-mPD-1 в качестве монотерапии и в комбинации были хорошо переносимы. Никаких серьезных изменений массы тела не наблюдалось ни в одной из групп обработки при всех тестируемых дозах. В ходе исследования не наблюдалось тяжелых или серьезных клинических явлений. В гистопатологических анализах было выявлено увеличенное количество лимфоцитов в селезенке (в белой пульпе) во всех группах обработки, в том числе в группах, получавших обработку антителом изотипического контроля, независимо от комбинации и без какой-либо зависимости от дозы. Других значимых результатов микроскопического исследования не наблюдалось. Две мыши из группы комбинации Ab изотипического контроля (10 мг/кг) и Mab к PD-1 (5 мг/кг) были найдены мертвыми после заключительного введения в последний день исследования. Гистопатологические анализы не обнаружили каких-либо причин смерти, связанных с приемом лекарственного средства.

Исследование эффективности.

Оценивали эффекты комбинированного лечения с помощью антитела к TGF- β и антитела к PD-1 у мышей C57BL/6, несущих подкожные сингенные опухоли толстой кишки из MC38. Мышам давали Ab1 в дозе 25 мг/кг, Mab x-anti-mPD-1 в дозе 5 мг/кг или их оба Q3D в течение трех недель. Это исследование демонстрирует, что комбинация Ab1 и Mab к mPD-1 характеризовалась значительно большей противоопухолевой активностью, чем только монотерапия. Материалы и способы, а также данные этого исследования подробно описаны ниже.

Материалы и способы.

Животные.

Самок мышей C57BL/6 получали из Charles River Labs (Уилмингтон, Массачусетс, США). Животным обеспечивали возможность акклиматизации в течение по меньшей мере трех дней до включения в исследование. Мыши были в возрасте 11 недель и имели массу от 17,0 до 20,9 г в начале исследования. У них был свободный доступ к еде (рацион для грызунов Harlan 2916, Массачусетс, США) и стерильной воде, и их содержали при цикле чередования 12 ч света и темноты.

Опухолевые клетки.

MC38 представляет собой линию клеток аденокарциномы толстой кишки. Клетки получали из Национального института онкологии (Бетесда, Мэриленд, США) и культивировали в 5% CO₂ при 37°C в полной среде (CM), которая содержала среду Мемориального института Розуэлла Парка (RPMI)-1640 с L-глутамином (Gibco, № по кат. 11875), дополненную 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой (HI FBS) (Gibco, № по кат. 10438026). Клетки собирали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (DPBS) (Gibco, № по кат. 14190) и 1×10⁶ клеток/200 мкл на мышью имплантировали подкожно (SC) самкам мышей C57BL/6 в правый бок.

Соединения.

Ab1 вводили животным в водном растворе. Его фильтровали через PES с диаметром пор 0,22 мкм и хранили в виде стерильных аликвот при 2-10°C. Антитело давали животным внутрибрюшинно (IP) в дозе 10 мл/кг, 25 мг/кг.

Антитело hIgG₄ к HEL (Crown Bioscience) применяли в качестве изотипического контроля для Ab1. Это антитело давали контрольным животным IP в дозе 10 мл/кг, 25 мг/кг.

Mab x-anti-mPD-1 (выше) предоставляли в DPBS (Gibco, № по кат. 14190-094) и давали животным IP в дозе 10 мл/кг, 5 мг/кг.

План исследования.

В день 0 60 животным имплантировали опухолевые клетки MC38. В день 8 после имплантации мышей со средним размером опухоли 50-75 мм³ объединяли и случайным образом распределяли в контрольные группы и группы обработки (по 10 мышей на группу). Обработки средой-носителем (PBS, pH 7,2), антителом hIgG₄ к HEL, Ab1 и Mab к mPD-1 в дозах, описанных выше, начинали в день 9 и повторяли в дни 12, 15, 18, 21 и 27. В качестве контролей использовали животных, получавших обработку средой-носителем и антителом hIgG₄ к HEL. Мышей проверяли ежедневно и отмечали нежелательные клинические реакции. Отдельных мышей взвешивали три-четыре раза в неделю до конца эксперимента.

Мышей подвергали эвтаназии, если наблюдали заболеваемость или потерю массы $\geq 20\%$. Опухоли измеряли штангенциркулем два раза в неделю до умерщвления по окончании. Когда размер опухоли достигал примерно 2000 мм³ или возникали проблемы со здоровьем животных (изъязвление 20% площади опухоли), животных подвергали эвтаназии и регистрировали дату смерти. Объемы солидных опухолей оценивали на основании двух измеренных размеров опухолей и рассчитывали согласно следующему уравнению:

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = [\text{длина (мм)} \times \text{ширина}^2 (\text{мм}^2)] / 2$$

Затем получали медианный процент регрессии для группы в данный день путем определения медианы индивидуальных процентов регрессии, рассчитанных для каждого животного в группе в этот день. День расчета определяли по дню, в который рассчитывали $\Delta T/\Delta C$ (т.е. соотношение медиан изменения объема опухоли относительно исходного уровня между группой обработки и контрольной группой), за исключением случаев, в которых медианный процент регрессии не отражал активность в группе. В этом случае день определяли по первому дню, в который медианный процент регрессии был максимальным. Регрессию определяли как частичную (PR), если объем опухоли уменьшался до 50% от объема опухоли в начале лечения. Полная регрессия (CR) считалась достигнутой, если объем опухоли составлял менее 14 мм³ или не мог быть зарегистрирован.

Эффективность.

Первичными конечными точками эффективности были изменения объема опухоли относительно исходного уровня, на которые указывали $\Delta T/\Delta C$, медианный процент регрессии, частичная регрессия и полная регрессия. Изменения объема опухоли для каждой группы обработки (Т) и контрольной группы (С) рассчитывали для каждого животного каждый день путем вычитания объема опухоли в день первой обработки (день определения стадии) из объема опухоли в указанный день наблюдения. Медианное значение ΔT рассчитывали для группы обработки, а медианное значение ΔC рассчитывали для контрольной группы. Рассчитывали соотношение $\Delta T/\Delta C$ и выражали в виде процентного количества по формуле

$$\Delta T/\Delta C = (\text{медианное значение дельта-Т/медианное значение дельта-С}) \times 100$$

Соотношение $\Delta T/\Delta C \leq 40\%$ считали свидетельствующим о терапевтической активности. Соотношение $\Delta T/\Delta C$, равное 0%, считали свидетельствующим об остановке роста опухоли. Соотношение $\Delta T/\Delta C < 0\%$ считали свидетельствующим о регрессии опухоли.

Процент регрессии опухоли определяли как процентное значение уменьшения объема опухоли в группе обработки в указанный день наблюдения по сравнению с объемом опухоли в начале исследования (t_0). В конкретный момент времени (t) и для каждого животного процент регрессии рассчитывали с помощью следующей формулы

$$\% \text{ регрессии (в момент t)} = [(объем - объем_0) / объем_0] \times 100$$

Затем рассчитывали медианный процент регрессии для группы в данный день путем определения медианы индивидуальных значений % регрессии, рассчитанных для каждого животного в группе. День расчета определяли по дню, в который рассчитывали $\Delta T/\Delta C$, за исключением случаев, в которых медианный процент регрессии не отражал активность в группе. В этом случае день определяли по первому дню, в который медианный процент регрессии был максимальным.

Статистический анализ.

В отношении изменений объема опухоли относительно исходного уровня проводили двухфакторный анализ типа ANOVA с обработкой и днем в качестве факторов (с повторными измерениями). В случае статистически значимого взаимодействия обработка×день или статистически значимых эффектов обработки после этого проводили контрастный анализ с поправкой Холма-Бонферрони на множественность для сравнения всех групп обработки с контрольной группой в каждый день от дня 8 до дня 27. Изменения объема опухоли относительно исходного уровня рассчитывали для каждого животного и каждого дня путем вычитания объема опухоли в день первой обработки (день 8) из объема опухоли в указанный день наблюдения.

Поскольку между группами наблюдалась неоднородность дисперсий, для модели типа ANOVA выбрали ковариационную структуру с составной симметрией (CS) с функцией group=(SAS Institute Inc. (2008), SAS/STAT 9.2 User's Guide, Кэри, Северная Каролина). На фиг. 5 и 6 медианы и абсолютное отклонение медианы (MAD) для каждой группы представлены для каждого дня измерения. В табл. 4-6 ниже медианы и нормализованные значения MAD ($nMAD = 1,4826 \times MAD$) для каждой группы представлены для каждого дня измерения. Все статистические анализы выполняли с помощью программного обеспечения SAS версии v9.2. Вероятность менее 5% ($p < 0,05$) считалась статистически значимой.

Результаты анализа эффективности.

Обработка опухоленесущих мышей C57BL/6 с помощью Ab1, Mab к PD-1 или комбинации этих двух антител также хорошо переносилась и была нетоксичной, на что указывали общее состояние здоровья и активность животных и отсутствие значимых изменений массы тела. В качестве монотерапии Ab1 в дозе 25 мг/кг Q3D и Mab к PD-1 в дозе 5 мг/кг Q3D вызывали потерю массы тела при максимальных значениях снижения только 3,4% (день 9) и 2,1% (день 9) соответственно. Комбинация Ab1 (25 мг/кг Q3D) и Mab к PD-1 (5 мг/кг Q3D) также хорошо переносилась, демонстрируя потерю массы тела при максимальных значениях снижения 1,3% (день 9) (табл. 4).

В качестве монотерапии Ab1 (25 мг/кг Q3D) и Mab к PD-1 (5 мг/кг Q3D) не демонстрировали нарушение роста опухоли по сравнению с животными, получавшими обработку изотипическим контролем для Ab1 (антителом hIgG₄ к HEL). Соотношение $\Delta T/\Delta C$ в день 27 обработки составляло соответственно 93 и 109% (табл. 4). Комбинация Mab к PD-1 и антитела hIgG₄ к HEL продемонстрировала минимальную противоопухолевую активность при $\Delta T/\Delta C$ 31% в день 27 обработки (что статистически значимо не от-

личается от контрольной группы) и полной регрессии, наблюдаемой только у 2 из 10 мышей. Однако комбинация Mab к PD-1 и Ab1 продемонстрировала лучшую противоопухолевую активность от дня 15 до дня 27 при $\Delta T/\Delta C$ -1 в день 27 обработки (что статистически значимо отличается от контрольной группы) и полной регрессии, наблюдаемой у 6 из 10 мышей (табл. 4).

Таблица 4

Активность Ab1 и Mab X-anti-mPD-1 в модели рака из MC38 у C57BL/6

Средство	ΔW^* (день максимально го снижения)	$\Delta T/\Delta C$, % (день 27)	Медианный % регрессии (день 27)	Р- значение* (день 27)	Регрессия (день 27)	
					PR	CR
Среда-носитель	-1,8 (D9)	100	–	–	0/10	0/10
Антитело hIgG ₄ к HEL (25 мг/кг)	–	104	–	0,7914	1/10	1/10
Ab1 (25 мг/кг)	-3,4 (D9)	93	–	0,9953	0/10	0/10
x-anti-mPD-1 (5 мг/кг)	-2,1 (D9)	109	–	0,5435	2/10	1/10
Ab1 (25 мг/кг) + x-anti-mPD-1 (5 мг/кг)	-1,3 (D9)	-1	24,5	<0,0001	6/10	6/10
Антитело hIgG ₄ к HEL (25 мг/кг) + x-anti-mPD-1 (5 мг/кг)	-3,0 (D9)	31	–	0,4020	2/10	2/10

* ΔW обозначает среднее изменение массы тела в % на группу при максимальном снижении.

** Р-значения получали с помощью контрастного анализа для сравнения каждой группы обработки с контролем с использованием поправки Холма-Бонферрони на множественность после двухфакторного анализа типа ANOVA с повторными измерениями изменений объема опухоли относительно исходного уровня. Вероятность менее 5% ($p < 0,05$) считалась статистически значимой.

В табл. 5 и 6 и на фиг. 5-7 представлены дополнительные данные, демонстрирующие активность антител в отдельности или в комбинации в отношении объемов опухоли в мышинной модели.

Таблица 5

Сравнение групп обработки с контрольной группой

Изменения объема опухоли относительно исходного уровня, мм ³ : медиана (nMAD), n и р-значение*						
Группа обработки	В целом	День 12	День 15	День 19	День 23	День 27
Среда-носитель	–	26,0 (20,02) n=10	71,5 (53,37) n=10	220,5 (117,87) n=10	528,0 (157,16) n=10	1610,0 (413,65) n=9

Антитело hIgG ₄ к HEL (25 мг/кг)	– 0,9629	17,0 (17,79) n=10 0,5197	65,5 (51,89) n=10 1,0000	182,5 (113,42) n=10 0,8858	491,5 (358,05) n=10 1,0000	1675,0 (621,21) n=9 0,7914
Ab1 (25 мг/кг)	– 0,9629	17,0 (15,57) n=10 0,4754	79,0 (43,74) n=10 1,0000	218,0 (83,03) n=10 0,8858	567,0 (344,70) n=10 1,0000	1496,5 (472,21) n=8 0,9953
Mab X-anti- mPD1 (5 мг/кг)	– 0,2439	–2,0 (21,50) n=10 0,0224	38,5 (68,20) n=10 0,1235	147,5 (149,74) n=10 0,2259	458,0 (280,21) n=10 0,2228	1748,0 (851,01) n=9 0,5435
Ab1 (25 мг/кг) + Mab x-anti- mPD-1 (5 мг/кг)	– 0,0007	–3,5 (10,38) n=10 0,0743	20,0 (20,02) n=10 0,0121	–0,5 (69,68) n=10 <.0001	–17,0 (51,15) n=10 <.0001	–9,0 (86,73) n=10 <.0001
Антитело hIgG ₄ к HEL (25 мг/кг) + x-anti-m-PD-1 (5 мг/кг)	– 0,2531	19,0 (37,81) n=10 0,5197	61,5 (65,98) n=10 0,2848	145,0 (160,12) n=10 0,2259	266,0 (398,82) n=10 0,1979	503,0 (841,38) n=8 0,4020

** Р-значения получали с помощью контрастного анализа для сравнения с контролем в каждый день с поправкой Холма-Бонферрони на множественность после двухфакторного анализа типа ANOVA в отношении изменений объема опухоли относительно исходного уровня.

Таблица 6

Ab1 и Mab X-anti-mPD-1 в качестве монотерапии по сравнению с комбинацией

Изменения объема опухоли относительно исходного уровня, мм ³ : медиана (nMAD), n и p-значение*						
Группа обработки	В целом	День 12	День 15	День 19	День 23	День 27
Ab1 (25 мг/кг) + Mab x-anti-mPD-1 (5 мг/кг)	–	–3,5 (10,38) n=10	20,0 (20,02) n=10	–0,5 (69,68) n=10	–17,0 (51,15) n=10	–9,0 (86,73) n=10
X-anti-mPD-1	–	–2,0	38,5	147,5	458,0	1748,0

(5 мг/кг)	0,040 5	(21,50) n=10 1,0000	(68,20) n=10 0,7631	(149,74) n=1 0,0276	(280,21) n=10 0,0004	(851,01) n=9 0,0024
Ab1 (25 мг/кг)	— 0,001 7	17,0 (15,57) n=10 1,0000	79,0 (43,74) n=10 0,0694	218,0 (83,03) n=10 0,0007	567,0 (344,70) n=10 <.0001	1496,5 (472,21) n=8 <.0001
Антитело hIgG ₄ к HEL (25 мг/кг) + Mab x-anti-mPD-1 (5 мг/кг)	—	19,0 (37,81) n=10	61,5 (65,98) n=10	145,0 (160,12) n=10	266,0 (398,82) n=10	503,0 (841,38) n=8
Mab X-anti-mPD-1 (5 мг/кг)	— 0,868 0	-2,0 (21,50) n=10 0,2024	38,5 (68,20) n=10 0,7631	147,5 (149,74) n=10 0,9476	458,0 (280,21) n=10 0,8576	1748,0 (851,01) n=9 0,8491
Антитело hIgG ₄ к HEL (25 мг/кг)	— 0,569 1	17,0 (17,79) n=10 1,0000	65,5 (51,89) n=10 0,5743	182,5 (113,42) n=10 0,4761	491,5 (358,05) n=10 0,2357	1675,0 (621,21) n=9 0,8491

* Р-значения получали с помощью контрастного анализа для сравнения комбинаций Ab1, антитела hIgG₄ к HEL и x-anti-mPD-1 с каждым из этих средств в качестве монотерапии в дозе, включенной в комбинацию, в каждый день с поправкой Холма-Бонферрони на множественность после двухфакторного анализа типа ANOVA в отношении изменений объема опухоли относительно исходного уровня.

Данные в таблицах и на фигурах показывают, что комбинация Ab1 в дозе 25 мг/кг Q3D и Mab x-anti-mPD-1 в дозе 5 мг/кг Q3D производила больший противоопухолевый эффект, чем любое из анти-тел в этих дозах. Это различие было статистически значимым при р-значениях в дни 19, 23 и 27, составляющих соответственно 0,0007, <0,0001 и <0,0001, в случае сравнения комбинации с Ab1 в качестве монотерапии. Это различие также было статистически значимым при р-значениях в дни 19, 23 и 27, составляющих соответственно 0,0276, 0,0004 и 0,0024, в случае сравнения комбинации с Mab x-anti-mPD-1 в качестве монотерапии (табл. 6). Для группы, получавшей комбинацию антитела hIgG₄ к HEL в дозе 25 мг/кг Q3D и Mab x-anti-mPD-1 в дозе 5 мг/кг Q3D, эффект лечения в отношении изменений объема опухоли относительно исходного уровня статистически значимо не отличался от эффекта любого из средств в отдельности в любой день измерения.

Таким образом, комбинация Ab1 в дозе 25 мг/кг Q3D и Mab к mPD-1 в дозе 5 мг/кг Q3D производила значительно больший противоопухолевый эффект, чем любое из средств, применяемых в отдельности от дня 15 до дня 27.

В другом исследовании авторы настоящего изобретения оценивали противоопухолевую активность комбинации Ab1 в дозе 1, 10 или 25 мг/кг и антитела мыши к PD-1 в дозе 5 мг/кг в отношении модели подкожной раковой опухоли толстой кишки мыши из MC38 у мышей C57BL/6J. Клетки аденокарциномы толстой кишки MC38 (NCI, Фредерик, Мэриленд) в экспоненциальной фазе роста культивировали в RPMI-1640, дополненной 10% FBS, во влажном инкубаторе с 5% CO₂ и затем имплантировали подкожно (1×10⁶ клеток) в бок самкам мышей C57BL/6J (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, Мэн). После достижения опухолями среднего размера 50-75 мм³ мышей объединяли и случайным образом распределяли в контрольные группы и группы обработки (по 10 мышей на группу). Затем опухоленесущих мышей обрабатывали путем внутрибрюшинного введения PBS, антитела изотипического контроля IgG₄ (25 мг/кг) или Ab1 (1, 10 и 25 мг/кг) три раза в неделю, пока каждое животное не получило в общей сложности от 6 до 7 доз. Опухоли измеряли цифровыми штангенциркулями 2 раза в неделю и объемы опухолей рассчитывали (мм³=L×W×H) и наносили на график с помощью GraphPad Prism. Мышей подвергали эвтаназии с помощью CO₂ по окончании исследования, если опухоли вырастали до >2000 мм³ или если опухоли демонстрировали изъязвление >20% поверхности опухоли.

В качестве монотерапии Ab1 в дозе 25 мг/кг Q3D и антитело α-PD-1 мыши в дозе 5 мг/кг демонстрировали частичную активность при полной регрессии соответственно у 2/8 и 4/8 мышей, несущих опухоли из MC38. Комбинация Ab1 в дозе 1, 10 или 25 мг/кг Q3D и антител α-PD-1 мыши в дозе 5 мг/кг Q3D

была терапевтически активной. В день 24 после имплантации при сравнении изменений объема опухоли относительно исходного уровня эффект комбинации Ab1 во всех тестируемых дозах и антител α -PD-1 мыши в дозе 5 мг/кг Q3D превышал эффект каждого из этих средств в качестве монотерапии при полной регрессии у $5/8$, $6/8$ и $7/8$ мышей для 1, 10 и 25 мг/кг Ab1 соответственно. В табл. 6А представлена сводная информация о результатах.

Таблица 6А

Противоопухолевые эффекты комбинаций Ab1+mAb к mPD-1

Группа	Обработка	Общее количество мышей	Количество случаев полного ответа/регрессии (частота случаев полного ответа/регрессии)
1.	PBS	8	0 (0%)
2.	25 мг/кг антитела изотипического контроля для Ab1 + 5 мг/кг антитела изотипического контроля для Mab к mPD-1	8	0 (0%)
3.	25 мг/кг Ab1 + 5 мг/кг антитела изотипического контроля для Mab к mPD-1	8	2 (25%)
4.	25 мг/кг антитела изотипического контроля для Ab1 + 5 мг/кг Mab x-anti-mPD-1	8	4 (50%)
5.	1 мг/кг Ab1 + 5 мг/кг Mab x-anti-mPD-1	8	5 (62,5%)
6.	10 мг/кг Ab1 + 5 мг/кг Mab x-anti-mPD-1	8	6 (75%)
7.	25 мг/кг Ab1 + 5 мг/кг Mab x-anti-mPD-1	8	7 (87,5%)
	5 мг/кг Mab x-anti-mPD-1		

Таким образом, эти данные доклинических исследований демонстрируют, что комбинация ингибирования PD-1 и ингибирования TGF- β способна обеспечивать ингибирование роста опухоли в большей степени, чем одна только блокада ингибитором контрольных точек.

Пример 6. Внутриопухолевые уровни TGF- β 1.

Внутриопухолевые уровни TGF- β 1 изучали в ксенотрансплантатной модели подкожной колоректальной раковой опухоли из LoVo на мышах BALB/c. Мышам инъектировали Ab1 либо Mab изотипического контроля в дозе 10, 25 или 50 мг/кг внутривенно каждые 3 дня в общей сложности в течение восьми IV введений, начиная с момента, когда объем опухоли составлял менее 100 мм³.

Образцы опухоли, которые хранили при -80°C в пластмассовых пробирках объемом 2 мл с керамическими шариками диаметром 2,8 мм (MoBio 13114-50), размораживали при комнатной температуре. Один миллилитр (мл) холодного лизирующего трис-буфера Meso Scale Diagnostic (MSD) (R60TX-2), до-

полненного 1× коктейлем ингибиторов протеаз и фосфатаз Halt™ (Thermo 78440), добавляли к ткани, которую затем гомогенизировали с помощью гомогенизатора Precellys® 24 Dual (Bertin Instruments) за два цикла при 6500 об/мин продолжительностью 20 с каждый при 4°C. Лизаты очищали путем центрифугирования в течение 10 мин при 20000×g в центрифуге Eppendorf 5417C при 4°C. Образцы надосадочной жидкости переносили в чистые охлажденные пробирки Eppendorf и дополнительно очищали путем центрифугирования в течение еще 20 мин, как описано выше. После этого образцы надосадочной жидкости переносили в 96-луночный пластмассовый блок для хранения, мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

На следующий день образцы размораживали при комнатной температуре и помещали на лед. Концентрацию белка в лизатах измеряли с помощью набора для анализа белка с использованием бицининовой кислоты (BCA) (Thermo 23225) в соответствии с инструкциями производителя. Лизаты нормализовали до концентрации белка примерно 8 мг/мл путем использования лизирующего трис-буфера MSD с ингибиторами фосфатаз (см. выше) и разделяли на аликвоты, которые помещали в пластмассовые микропробирки.

Концентрацию TGF-β1 в нормализованных лизатах опухолей измеряли в соответствии с инструкциями производителя с использованием набора для TGF-β1 человека (MSD, K151IUC-2) с помощью электрохемилюминесцентного анализа. Рекомбинантный TGF-β1 мыши (R&D Systems, № по кат. 7666-MB-005) в серийном разведении в лизирующем буфере MSD применяли в качестве калибровочного стандарта. Образцы загружали на планшет в двух повторностях. Электрохемилюминесцентный сигнал измеряли с помощью планшет-ридера MESO SECTOR S600 (MSD), а концентрацию TGF-β1 в образцах оценивали количественно с помощью программного обеспечения MSD Discovery Workbench v4.0 на основании калибровочной кривой.

Среднюю концентрацию для образцов в двух повторностях рассчитывали с помощью программного обеспечения. Значения концентрации, определенные с помощью программного обеспечения как "ниже диапазона аппроксимации кривой" или "ниже диапазона выявления", заменяли нулевыми значениями. Чтобы рассчитать концентрацию TGF-β1 на мг общего белка, концентрацию, измеренную в анализе (пг/мл), делили на концентрацию белка (мг/мл) в образцах.

Результаты показали, что внутриопухолевые уровни TGF-β1 у мышей, которым инъецировали изотипический контроль, имели медиану 21,4 пг/мг общего белка, а соответствующие уровни у мышей, которым инъецировали Ab1, были невыявляемыми (фиг. 8).

Чтобы продемонстрировать значимость вышеуказанных результатов для людей, авторы настоящего изобретения тестировали десять образцов колоректальной опухоли человека и десять образцов меланомной опухоли человека в отношении их внутриопухолевых уровней TGF-β1, как описано выше, с помощью вышеописанного способа. В образцах CRC человека уровни TGF-β1 находились в диапазоне от приблизительно 7 до 25 пг/мг. В образцах меланомы человека уровни TGF-β1 находились в диапазоне от приблизительно 1 пг/мг вплоть до 43 пг/мг. Эти данные дополнительно обосновывают применение терапевтических средств на основе антител к TGF-β1, таких как Ab1, при лечении опухолей в отдельности или в сочетании с другими ингибиторами контрольных точек иммунного ответа, такими как антитела к PD-1.

Пример 7. Фармакокинетические исследования Ab1.

В этом примере описаны исследования, в которых получали характеристики фармакокинетического (PK) профиля Ab1 и сравнивали его с профилем фрезолимумаба. В одном исследовании пяти группам подвергнутых канюлированию крыс Спрег-Доули внутривенно давали однократную дозу 5 мг/кг Ab1 или фрезолимумаба. В каждой группе было пять самок и пять самцов. Кровь у крыс собирали через 0,25, 6, 24, 48, 72, 144, 192 и 240 ч после введения дозы. Концентрации Ab1 и фрезолимумаба в сыворотке крови определяли с помощью ELISA. Сопоставимость устанавливали, если 90% доверительные интервалы для соотношения AUC (тестируемого материала и эталона) находились в диапазоне от 80 до 125%.

Изменение концентраций антител в сыворотке крови с течением времени в пяти группах крыс показано на фиг. 9А. PK-параметры для групп 2, 4 и 5 (см. условные обозначения на фиг. 9А) показаны в табл. 7 ниже. Это исследование показало, что Ab1 имело линейный характер PK-профиля с гораздо более длительным периодом полужизни (среднее значение $T_{1/2}$ 7,1 дня в сравнении с 4,3 дня) и более низкой скоростью выведения (CL 0,30 мл/ч/кг в сравнении с 0,51 мл/ч/кг), чем у фрезолимумаба. Данные показали, что Ab1 характеризовалось в 1,7 раза более высоким уровнем воздействия у крыс, чем фрезолимумаб.

Таблица 7

Сравнение PK-параметров фрезолимуаба и Ab1

PK-параметры	Фрезолимуаб (партия 2)	Ab1 (партия 1)	Ab1 (партия 2)
$t_{1/2}$ (ч)	103,21 ± 12,98	181,83 ± 80,92*	158,38 ± 66,73
C_{max} (мкг/мл)	114,56 ± 16,42	116,60 ± 16,78	109,72 ± 18,49
V_z (мл/кг)	75,22 ± 15,21	78,35 ± 26,33	63,47 ± 10,65
CL (мл/ч/кг)	0,51 ± 0,10	0,31 ± 0,04*	0,30 ± 0,05*
AUC_{last} (ч*мкг/мл)	8046 ± 1210	10007 ± 1180*	11223 ± 1035*
AUC_{0-INF} (ч*мкг/мл)	10107 ± 1613	16322 ± 2523*	17553 ± 4130*

* Средние значения $\pm$ SD в группе статистически значимо отличаются от группы "фрезолимуаб (B2)" (группа 2 на фиг. 9А).

Дополнительное PK-исследование Ab1 (исследование 2) проводили в группах макаков-крабоедов. В каждой группе было пять самок и пять самцов, которым путем внутривенной инфузии давали однократную дозу Ab1 в количестве 1 мг/кг (фиг. 9В) или 10 мг/кг (фиг. 9D) или пять еженедельных доз Ab1 в количестве 1 мг/кг (фиг. 9С) или 10 мг/кг (фиг. 9Е) на дозу. Изменение концентраций Ab1 в сыворотке крови с течением времени у обезьян показано на фиг. 9В-9Е. Изменение концентраций фрезолимуаба в сыворотке крови с течением времени, который давали обезьянам в однократных или повторных дозах Q2W (раз в две недели) в предыдущих исследованиях, также показано на фигурах для сравнения. Эти данные показывали, что Ab1 также имело линейный характер PK-профиля у обезьян и демонстрировало более высокий уровень воздействия после как однократных, так и повторных введений доз, чем фрезолимуаб в количестве как 1, так и 10 мг/кг на дозу. При однократном введении дозы 10 мг/кг Ab1 характеризовалось периодом полужизни, составляющим 13 дней, тогда как фрезолимуаб характеризовался периодом полужизни, составляющим 4,5 дня; Ab1 характеризовалось CL, составляющей приблизительно 0,40 мл/ч/кг, тогда как фрезолимуаб характеризовался CL, составляющей 0,66 мл/ч/кг. Как и исследование у крыс, исследование у обезьян также показало, что Ab1 характеризовалось в приблизительно 1,7 раза более высоким уровнем воздействия, чем фрезолимуаб.

Вышеописанные исследования демонстрируют, что Ab1 характеризуется статистически значимо более длительным периодом полужизни, более длительным периодом очищения и более высоким уровнем биологического воздействия *in vivo*, чем фрезолимуаб.

Кроме того, исследование у мышей Balb/C, несущих опухоли из Ab12, показало, что Ab1 имеет сходные PK-профили независимо от того, вводят ли его внутривенно или внутрибрюшинно.

Используя аллометрическое масштабирование в двухкамерной модели, авторы настоящего изобретения предсказали следующие PK-параметры для человека массой 70 кг на основании данных от обезьян (табл. 8).

Таблица 8

Аллометрическое моделирование PK-параметров

PK-параметры	Ab1 у обезьян	Ab1 у людей
$T_{1/2}$ (день)	13,1	20,9
CL (мл/ч/кг)	0,392	5,7
V_1 (центральная камера) (л)	0,104	2,43
Q (мл/ч)	3,18	46
V_2 (периферическая камера) (л)	0,0693	1,62

Предсказанные PK-параметры для Ab1 у людей также являются более благоприятными, чем для фрезолимуаба. Например, фрезолимуаб с CL 12,3 мл/ч/кг у людей характеризуется более высокой скоростью очищения, чем Ab1.

Пример 8. Токсикологические исследования Ab1.

Токсикологические исследования Ab1 проводили у крыс и макаков-крабоедов. Фармакологические конечные точки безопасности оценивали в исследовании повторных доз согласно GLP (надлежащей лабораторной практике) еженедельно в течение 5 недель. При дозах до 10 мг/кг/доза (концентрация 2 мг/мл) у обезьян и до 30 мг/кг/доза (концентрация 6 мг/мл) у крыс никаких гистопатологических проявлений, связанных с Ab1, в местах инъекций не наблюдалось. В этом исследовании ни на одном из тестируемых уровней дозы не было отмечено связанных с Ab1 эффектов в неврологических исследованиях в отношении температуры тела, частоты дыхательных движений, кровяного давления и параметров ECG.

Было обнаружено, что NOAEL (максимальная доза без наблюдаемых нежелательных эффектов) для крыс составляла 3 мг/кг/доза при еженедельном повторном введении доз в течение 5 недель, и было обнаружено, что STD10 (опасная токсическая доза, вызывающая смерть или необратимую тяжелую токсичность у 10% животных) для крыс составляла от 3 до 10 мг/кг/доза. Токсичность включала пролиферацию клеток сердечных клапанов, характеризующуюся множественными утолщенными узелками; и аномальные состояния легких, такие как смешанно-клеточный альвеолярный экссудат, смешанно-клеточные периваскулярные инфильтраты, гипертрофия мышечных артерий, кровоизлияние и/или увеличение массы легких.

Было обнаружено, что дозы NOAEL и HNSTD (т.е. самая высокая неопасная токсическая доза, выше которой имеют место летальность, опасная для жизни токсичность или необратимая токсичность) для обезьян при еженедельном повторном введении доз в течение 5 недель составляли 10 мг/кг/доза (в сравнении с фрезолимуабом, у которого NOAEL для обезьян, как было показано, составляет 1 мг/кг при введении раз в две недели в течение 7 или 13 доз или Q3D в течение 4 недель). См. также данные, показанные в табл. 9 ниже.

Таблица 9

Сводная информация о токсикологических исследованиях у крыс и обезьян

Токсикологические параметры	Крысы	Обезьяны
LD (летальная доза)	50 мг/кг/доза ¹	> 10 мг/кг/доза
HNLD (самая высокая нелетальная доза)	30 мг/кг/доза	10 мг/кг/доза
STD10	3–10 мг/кг/доза	NA
HNSTD	NA	10 мг/кг/доза
NOAEL	< 3 мг/кг/доза	10 мг/кг/доза
Основные органы-мишени (гистопатология)	Сердце, легкие, кости, зубы	Не идентифицированы

¹ На основании поискового исследования.

NA - Нет данных.

Исходя из приведенных выше токсикологических данных ожидается, что Ab1 можно безопасно вводить пациентам-людям при уровне дозы от приблизительно 0,05 до 0,5 мг/кг раз в неделю или реже, например раз в две недели.

Пример 9. Эффективность монотерапии с помощью антитела к TGF-β in vivo.

В этом исследовании авторы настоящего изобретения изучали эффект 1D11, антитела IgG₁ мыши к TGF-β крупного рогатого скота, которое перекрестно реагирует с TGF-β1, 2 и 3 человека и мыши, в модели метастатической сингенной опухоли. В этой модели клетки меланомы мыши B16-F10 вводили в подушечку стопы мышей C57BL/6 IV и они образовывали метастазы в дренирующем лимфатическом узле мышей. В то время как обработка контрольным антителом 13C4 не производила эффект, при обработке с помощью 50 мг/кг 1D11 три раза в неделю, начиная с момента через день после инокуляции опухоли, полностью устранялись метастазы.

Чтобы исследовать роль иммунного ответа, мышам, у которых имеется дефицит гена β2-микроглобулина и, следовательно, отсутствует иммунный ответ с участием CD8⁺ цитотоксических Т-клеток, имплантировали B16-F10 в подушечку стопы, и их обрабатывали, как описано ранее. В отличие от результатов, наблюдаемых у иммунокомпетентных мышей, 1D11 не производило эффект в отношении количества метастазов в дренирующем лимфатическом узле у этих мышей. Данные результаты позволяют предположить, что механизм действия ингибирования TGF-β зависит от адаптивного клеточного иммунитета.

Пример 10. Сигнатуры TGF-β при различных формах рака.

В предыдущих исследованиях было показано, что пациенты с меланомой, которые были неспособны отвечать на терапию с помощью антитела к PD-1, имеют транскрипционную сигнатуру IPRES (Hugo et al., Cell (2016), 165:35-44). Для изучения механизма врожденной устойчивости к монотерапии с

помощью антитела к PD-1 авторы настоящего изобретения исследовали транскрипционные сигнатуры пациентов, не отвечающих на терапию, в сравнении с пациентами, отвечающими на терапию. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что сравнение этих профилей с помощью анализов представленности групп генов с базой данных более чем 1 млн профилей выявило сильную корреляцию между ответом на антитело к PD-1 и активацией передачи сигнала от TGF- β в опухолях. Эти данные позволяют предположить, что при меланоме на исходном уровне TGF- β ассоциирован с врожденной устойчивостью к монотерапии с помощью антитела к PD-1.

Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили не только наличие корреляции между ответом на антитело к PD-1 и активацией передачи сигнала от TGF- β , но также и то, что корреляция была сильной ($R=0,59$, p -значение согласно t -критерию $<9E-4$). Поэтому авторы настоящего изобретения пришли к входному указанию 1: опосредованная TGF- β иммунодепрессия при меланоме (например, метастатической меланоме) может способствовать врожденной устойчивости. Более того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что индуцированные TGF- β изменения экспрессии генов подавлялись при обработке с помощью 1D11, что подтверждало специфичность сигнатуры активации TGF- β . Эти результаты подтверждают преимущества применения терапевтических средств на основе антител к TGF- β и антител к PD-1 в комбинации для лечения пациентов с раком, которые не отвечают на монотерапию с помощью антитела к PD-1.

Анализ этой корреляции в других типах опухолей, помимо меланомы, выявил, что мезенхимальные опухоли (например, CRC, HCC, плоскоклеточная карцинома головы и шеи и рак яичника) также характеризовались как повышенной активацией TGF- β , так и повышенной предсказанной устойчивостью к антителу к PD-1. Это обнаружение согласовывалось с ролью передачи сигнала от TGF- β в EMT. Поэтому авторы настоящего изобретения пришли к входному указанию 2: при мезенхимальных опухолях, особенно инфильтрированных иммунными клетками, пользу может принести комбинированная терапия с помощью антитела к TGF- β и антитела к PD-1. Методы машинного обучения применяли для идентификации из более чем 30 генов-маркеров EMT меньшего количества генов, например ACTA2, VIM, MGP, ZEB2 и ZWINT, которые можно применять для отбора мезенхимальных опухолей. Например, было обнаружено, что ACTA2 и VIM подходят для разных типов опухолей. Соответственно транскрипционная сигнатура активации TGF- β и гены в этой сигнатуре экспрессии могут служить в качестве применимых биомаркеров для отбора пациентов с раком на исходном уровне для комбинированной терапии с помощью антитела к TGF- β и антитела к PD-1.

Для исследования биомаркеров в микроокружении опухоли иммунную среду опухолей пациентов при CRC и меланоме оценивали с помощью мультиплексного ИНС-анализа MultiOmyx. Мультиплексирование проводили с 12 биомаркерами (совместно описывающими 22 типа иммунных клеток) на одном FFPE-срезах из каждого образца опухоли. Исследования включали диапазон воспаления для оценивания того, насколько хорошо данные аналитические инструменты оценивают каждый тип опухоли и коррелируют с возможными эффектами лечения. Были разработаны статистические способы для оценки различий на уровне популяции клеток, в том числе анализ согласованности повторностей, вулканные диаграммы для дисперсионных анализов и корреляционные матрицы. Анализ MultiOmyx продемонстрировал превосходную техническую воспроизводимость и точность, благоприятный динамический диапазон, различия в статусе воспаления в отдельных иммунных клетках и представляющих интерес областях и включал как положительные, так и отрицательные корреляции между популяциями клеток.

Пример 11. Изменения уровней TGF- β 1, MIP-2 и KC/GRO в опухолях из MC38 после обработки с помощью Ab1 вместе с антителом к PD1 или без него.

Чтобы продемонстрировать нейтрализацию TGF- β , оценивали способность Ab1 (с антителом к PD-1 или без него) влиять на экспрессию цитокинов в опухолях.

Мышей, несущих опухоль из MC38, обрабатывали с помощью однократной дозы PBS или антитела к PD-1 в отдельности (5 мг/кг) или возрастающих доз Ab1 (10, 25 или 50 мг/кг, i.p.) в комбинации с антителом к PD-1 (5 мг/кг) при объеме опухолей от 61 до 110 мм³. Опухоли собирали через 1, 6, 10, 24, 72 и 168 ч после обработки, мгновенно замораживали в пластмассовых пробирках объемом 2 мл с керамическими шариками диаметром 2,8 мм (Precellys KT3961-1007.2) и хранили при -80°C. Для получения лизатов опухоли размораживали при комнатной температуре. Один мл холодного лизирующего трис-буфера Meso Scale Diagnostics (MSD) (R60TX-2), дополненного 1× коктейлем ингибиторов протеаз и фосфатаз Halt™ (Thermo 78440), добавляли к ткани, которую затем гомогенизировали с помощью гомогенизатора Precellys®24 Dual (Bertin Instruments) за 2 цикла при 6500 об/мин продолжительностью 20 с каждый при 4°C. Лизаты очищали путем центрифугирования в течение 10 мин при 20000×g в центрифуге Eppendorf 5417C при 4°C. Образцы надосадочной жидкости переносили в чистые охлажденные пробирки Eppendorf и дополнительно очищали путем центрифугирования в течение еще 30 мин, как описано выше. Образцы надосадочной жидкости переносили в 96-луночный пластмассовый блок для хранения и помещали на лед. Концентрацию белка в лизатах измеряли с помощью набора для анализа белка с использованием бицинониновой кислоты (BCA) (Thermo 23225) в соответствии с инструкциями производителя. Лизаты нормализовали до концентрации белка примерно 5 мг/мл путем использования лизирующего трис-

буфера MSD с ингибиторами протеаз и фосфатаз (см. выше), разделяли на аликвоты, которые помещали в пластмассовые микропробирки, мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C .

Концентрации активного TGF β -1 в лизатах опухолей измеряли с использованием набора для TGF β -1 человека (MSD, K151IUC-2) с помощью электрохемилюминесцентного анализа. Рекombинантный TGF β -1 мыши (R&D Systems, 7666-MB-005) в серийном разведении в лизирующем буфере MSD применяли в качестве калибровочного стандарта. Нормализованные лизаты опухолей, полученные, как описано выше, размораживали, и анализ проводили в соответствии с инструкциями производителя. Кислотную обработку образцов не проводили, чтобы количественно определить только активную форму TGF β -1, присутствующую в опухолях, а не общий TGF β -1, который включает в себя TGF β -1 в комплексе с пептидом, ассоциированным с латентностью. Образцы загружали на планшеты в двух повторностях. Электрохемилюминесцентный сигнал измеряли с помощью планшет-ридера MESO SECTOR S600 (MSD), а концентрацию TGF β -1 в образцах оценивали количественно с помощью программного обеспечения MSD Discovery Workbench версии 4.0 на основании калибровочной кривой.

Было показано, что по сравнению с животными, получавшими обработку с помощью PBS либо антитела к PD-1 в отдельности, животные, получавшие обработку с помощью Ab1 при всех уровнях доз (10, 25 или 50 мг/кг) вместе с антителом к PD-1 (5 мг/кг), имеют уменьшенные уровни активного TGF β -1 в опухолях, что демонстрирует связывание Ab1 с его мишенью *in vivo* (фиг. 10A). Уменьшенные уровни активного TGF β -1 наблюдались в течение одного часа и сохранялись в течение по меньшей мере 168 ч.

MIP-2 (CXCL2) и KC/GRO (CXCL1) представляют собой хемотаксические хемокины для гранулоцитов, в том числе нейтрофилов. Уровни MIP-2 и KC/GRO также оценивали в этих же образцах. Было показано, что после обработки с помощью Ab1 вместе с антителом к PD-1 внутриопухолевые уровни MIP-2 увеличивались по меньшей мере в 4 раза у животных, получавших обработку с помощью Ab1 вместе с антителом к PD-1, по сравнению с животными, получавшими обработку с помощью PBS либо антитела к PD-1 в отдельности; и было показано, что повышение уровней MIP-2 сохраняется в течение по меньшей мере 168 ч (фиг. 10B). Аналогично было показано, что уровни KC/GRO увеличиваются, хотя и в более поздние по сравнению с MIP-2 моменты времени 72 и 168 ч (фиг. 10C). Таким образом, комбинация Ab1 и mAb к PD-1 индуцировала уменьшение уровней активного TGF β -1 раньше, чем увеличение уровней MIP-2 и KC/GRO. Эти результаты демонстрируют, что Ab1 может уменьшать уровни TGF β и ингибировать его в микроокружении опухоли. Кроме того, наблюдаемое увеличение уровней MIP-2 и KC/GRO указывает на то, что они являются цитокинами, на которые влияет нейтрализация TGF β , и, таким образом, могут служить потенциальными биомаркерами у пациентов, получающих лечение с помощью Ab1.

Пример 12. Восстановление образования скоплений NK-клеток при обработке с помощью Ab1.

Известно, что TGF β влияет на иммунную систему, ингибируя активность различных типов иммунных клеток.

Сообщалось, что TGF β ингибирует активность естественных клеток-киллеров (NK) и опосредованную NK-клетками ADCC (Trotta et al., *Journal of immunology* (2008), 181:3784-3792). Недавно сообщалось, что NK-клетки образуют плотные скопления в качестве механизма повышения их активности и активации посредством локализации IL-2 в этих плотно упакованных скоплениях (Kim et al., *Scientific Reports* (2017), 7:40623). Показано, что очищенные NK-клетки человека, культивируемые *in vitro* в присутствии IL2, образуют эти плотно упакованные скопления.

В настоящем исследовании авторы настоящего изобретения оценивали эффекты TGF β в отсутствие или в присутствии Ab1 в отношении "образования скоплений" NK-клеток. NK-клетки выделяли заново из крови здоровых доноров путем негативного отбора с помощью реагента RosetteSep для NK-клеток в соответствии с протоколами производителя (Stem Cell Technologies). NK-клетки культивировали в количестве $1,2 \times 10^5$ клеток/лунка в среде MyeloCult (Stem Cell Technologies), дополненной IL-2 (100 МЕ/мл), в круглодонных аналитических планшетах (Costar). TGF β -1 добавляли до конечной концентрации 0,1, 1 или 10 нг/мл в присутствии нерелевантного IgG $_4$ либо Ab1 в концентрации 100 мкг/мл, как указано. Клетки культивировали в течение 72 ч и образование скоплений NK-клеток визуализировали путем захвата изображений на микроскопе Nikon.

Было показано, что при добавлении возрастающих доз TGF β -1 ингибируется образование скоплений NK-клеток. Было показано, что скопления NK-клеток формируются при добавлении к культурам NK-клеток Ab1, но не контрольного антитела IgG $_4$. Этот результат демонстрирует, что нейтрализация TGF β влияет на активацию NK-клеток, что приводит к увеличению активности и пролиферации NK-клеток, содействуя противоопухолевому ответу иммунной системы.

Пример 13. Устранение опосредованного TGF β подавления выработки IFN- γ в пролиферирующих CD8 $^{+}$ T-клетках при обработке с помощью Ab1.

Сообщалось, что в дополнение к врожденной иммунной системе TGF β ингибирует активность CD8 $^{+}$ T-клеток (Flavell et al., *Nature Reviews Immunology* (2010), 10:554-567). Для исследования роли TGF β и Ab1 в активности CD8 $^{+}$ T-клеток создавали систему для анализа MLR (реакции смешанной

культуры лимфоцитов), в которой очищенные $CD3^+$ клетки человека смешивали с клетками BLCL. Проллиферацию $CD8^+$ клеток и выработку ими $IFN-\gamma$ сначала оценивали в присутствии $TGF-\beta$. В частности, $CD3^+$ клетки выделяли с помощью набора для обогащения Т-клеток EasySep (StemCell Technologies) из PBMC от нормальных здоровых доноров, фракционированных после выделения в градиенте фикола. Затем $CD3^+$ клетки метили с помощью CellTrace фиолетового в соответствии с протоколом производителя (ThermoFisher). Анализ MLR проводили путем смешивания меченых $CD3^+$ клеток (2×10^5 клеток) с облученными клетками BLCL (Astarte Bio) (2×10^4 клеток; 2 мин) в RPMI, дополненной 10% FBS. Как указано, к культурам добавляли $TGF-\beta 1$, контрольное антитело IgG_4 и/или Ab1, и культуры инкубировали при $37^\circ C$ с 5% CO_2 в течение 4 дней. Затем клетки стимулировали в течение 4 ч в присутствии коктейля для стимуляции клеток с PMA (eBioscience) и коктейля ингибиторов транспорта белков (eBioscience). Живые клетки различали при окрашивании красителем для определения жизнеспособности Zombie NIR (BioLegend) на льду и промывали буфером для FACS. Клетки фиксировали в буфере True-Nuclear (BioLegend), промывали, осаждали и ресуспендировали в буфере для FACS. Клетки готовили для проточной цитометрии путем окрашивания антителом к huCD4, конъюгированным с BV650, антителом к huCD8, конъюгированным с PERCP/Cy5.5, антителом к huCD3, конъюгированным с FITC, и антителом к huIFN γ , конъюгированным с PE (BioLegend). Проточную цитометрию проводили на BD Canto и результаты анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo с гейтированием по живым клеткам, синглетам и $CD3^+$ клеткам. Процентное содержание $IFN\gamma^+CD8^+$ Т-клеток определяли количественно при гейтировании по $CD8^+$ клеткам, которые пролиферировали исходя из уменьшенной интенсивности окрашивания CellTrace фиолетовым, и были положительными по окрашиванию на $IFN-\gamma$. FMO использовали в качестве контроля для окрашивания всеми антителами.

Было показано, что при включении $TGF-\beta$ в анализ MLR уменьшается процентное содержание $CD8^+$ Т-клеток, которые были положительными на $IFN-\gamma$, примерно в 4 раза (фиг. 11A). Включение Ab1 или контрольного Ab не производило эффект в отношении образования этих пролиферирующих $IFN\gamma^+CD8^+$ клеток в отсутствие $TGF-\beta$ (фиг. 11B). Однако включение Ab1, но не контрольного антитела, позволяло восстановить пролиферацию клеток $IFN\gamma^+CD8^+$ дозозависимым образом. Эти результаты демонстрируют, что нейтрализация $TGF-\beta$ способна влиять на адаптивную иммунную систему путем блокирования иммунодепрессивных эффектов $TGF-\beta$ в отношении пролиферации эффекторных $CD8^+$ клеток, которые экспрессируют $IFN-\gamma$. Предполагается, что эти $IFN\gamma^+CD8^+$ Т-клетки играют важную роль в противоопухолевом иммунитете (Ikeda et al., Cytokine Growth Factor Rev. (2002), 13:95-109).

Пример 14. Ответы на терапию с помощью антитела к $TGF-\beta$ в сингенных мышиных моделях.

В этом исследовании авторы настоящего изобретения изучали, какие сингенные мышиные модели можно применять для предсказания ответа на лечение с помощью антитела Ab1 к $TGF-\beta$ и антитела к PD-1. Для стратификации мышиных моделей авторы настоящего изобретения оценивали инфильтрацию $CD8^+$ Т-клеток в опухоли у мышей и активацию сигнального пути $TGF-\beta$. Инфильтрацию $CD8^+$ Т-клеток анализировали на основании сигнатуры $CD8^+$ Т-клеток согласно данным, полученным при секвенировании РНК. В семнадцати различных мышиных сингенных моделях с опухолевыми клетками, образующимися при нескольких показаниях (как показано под осью x на фиг. 12A и 12B), подвергали транскрипционному профилированию с помощью полнотранскриптного секвенирования РНК. Этот "набор" сингенных моделей создавали в генетическом окружении широко используемой линии C57/BL6 с использованием 5-7 биологических повторностей на модель. После секвенирования на Illumina 2000 получали профили экспрессии генов, выраженные в транскриптах на миллион (TPM), с помощью стандартной обработки необработанных последовательностей ридов с использованием алгоритма выравнивания STAR и алгоритма оценивания обилия транскриптов Cufflinks. Полученную матрицу данных по нескольким образцам в заключение подвергали квантильной нормализации.

На фиг. 12A показано относительное обилие $CD8^+$ Т-клеток ($\log_2$ -преобразованное) в пределах набора. Относительное обилие $CD8^+$ Т-клеток оценивали с использованием уникального маркерного гена $CD8B$, который, как было показано, является высокоспецифичным индикатором присутствия $CD8$ Т-клеток (Becht et al., Curr. Opin. Immunol. (2016), 39:7-13; и Becht et al., Genome Biol. (2016), 17:218). На каждой диаграмме размаха обобщен диапазон значений по всем биологическим повторностям. Модель MC38 показала приблизительно в 2 раза большую инфильтрацию $CD8^+$ Т-клеток, чем модель EMT6 (левая и правая рамки соответственно). Модели лимфомы из A20 и EL4 продемонстрировали соответственно в целом самый высокий и самый низкий уровни инфильтрации $CD8^+$ Т-клеток при пренебрежимо малом количестве $CD8^+$ Т-клеток в EL4.

Линии клеток мыши MC38, MC38.ova, CT26 и L1210 демонстрировали самые высокие уровни экспрессии генов сигнатуры $CD8$. Кроме того, было показано, что линия раковых клеток молочной железы EMT-6 характеризуется инфильтрацией Т-клеток, близкой к исходному уровню, что согласуется с недавними сообщениями о том, что опухоли из EMT6 имеют фенотип "иммунного исключения" (S. Mariathasan и соавт., 2017, Иммуноонкологический конгресс ESMO, Женева, Швейцария).

На фиг. 12B показана активация сигнального пути $TGF-\beta$ в пределах набора. 170-генную транскрипционную сигнатуру активации сигнального пути $TGF\beta$, определенную в результате стимуляции кле-

ток MCF7 in vitro с помощью TGF- β и подтвержденную путем сравнения с несколькими другими сигнатурами TGF- β , использовали для назначения балла активации сигнального пути каждому профилю в наборе. Баллы вычисляли с использованием "анализа представленности регулируемых групп генов" (rGSEA, Theilhaber et al., 2014) и выражали в виде $\log_2$ перепредставленности сигнатурных генов относительно генетического окружения. В то время как модели MC38 демонстрировали среднюю активацию, модель EMT6 демонстрировала очень высокую активацию сигнального пути TGF- β (левая и правая рамки соответственно).

Пример 15. Эффекты комбинации Ab1 и антитела к PD-1 в мышинной модели рака молочной железы.

В этом исследовании авторы настоящего изобретения изучали терапевтические эффекты Ab1 при использовании вместе с антителом к PD-1 или без него. Раковые клетки молочной железы EMT-6 (CRL-2755, ATCC) в экспоненциальной фазе роста культивировали в RPMI-1640, дополненной 10% FBS, во влажном инкубаторе с 5% CO₂ и затем имплантировали подкожно ($0,5 \times 10^6$ клеток/мышь) в бок самкам мышей BALB/c (Shanghai Lingchang Bio-Technology Co. Ltd, Шанхай, Китай). После достижения опухолями среднего размера 68-116 мм³ мышей объединяли и случайным образом распределяли в контрольные группы и группы обработки (по 10 мышей на группу). Затем опухоленесущих мышей обрабатывали путем внутрибрюшинного введения PBS, Ab1 (10 и 25 мг/кг) три раза в неделю для каждого животного в общем количестве 6 доз. Опухоли измеряли цифровыми штангенциркулями 2 раза в неделю и объемы опухолей рассчитывали (мм³=L×W×H) и наносили на график с помощью GraphPad Prism. Мышей подвергали эвтаназии с помощью CO₂ по окончании исследования, если опухоли выросли до >3000 мм³ или если опухоли демонстрировали изъязвление >20% поверхности опухоли.

В качестве монотерапии Ab1 в дозе 10 или 25 мг/кг Q3D и антитело α -PD-1 мыши в дозе 5 мг/кг демонстрировали частичную активность при полной регрессии соответственно у $1/10$, $2/10$ и $2/10$ мышей, несущих опухоли из EMT-6. Комбинация Ab1 в дозе 10 или 25 мг/кг Q3D и антител α -PD-1 мыши в дозе 5 мг/кг Q3D была терапевтически активной. В день 31 после имплантации при сравнении изменений объема опухоли относительно исходного уровня эффект комбинации Ab1 во всех тестируемых дозах и антитела α -PD-1 мыши в дозе 5 мг/кг Q3D превышал эффект каждого из этих средств в качестве монотерапии при полной регрессии у $7/10$ и $4/10$ мышей для 10 и 25 мг/кг Ab1 соответственно. В табл. 10 представлена сводная информация о результатах.

Таблица 10

Эффекты комбинации Ab1/антитело к mPD-1 в мышинной модели EMT-6

Группа	Обработка	Общее количество мышей	Количество случаев полного ответа (частота случаев полного ответа)
1.	PBS	10	0 (0%)
2.	5 мг/кг Mab x-anti-mPD-1	10	2 (20%)
3.	10 мг/кг Ab1	10	1 (10%)
4.	25 мг/кг Ab1	10	2 (20%)
5.	10 мг/кг Ab1 + 5 мг/кг Mab x-anti-mPD-1	10	7 (70%)
6.	25 мг/кг Ab1 + 5 мг/кг Mab x-anti-mPD-1	10	4 (40%)

Если в данном документе не определено иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, должны иметь значения, которые обычно понимаются средними специалистами в данной области. Иллюстративные способы и материалы описаны ниже, хотя при практическом осуществлении или при тестировании настоящего изобретения также можно применять способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе. Все публикации и другие литературные источники, упомянутые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте. В случае противоречий настоящее описание, в том числе определения, будет иметь преимущественную силу. Хотя в данном документе цитируется ряд документов, данное цитирование не является признанием того, что любой из этих документов образует часть общеизвестных знаний в данной области техники. Кроме того, если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе включают множественное число, а термины во множественном числе включают единственное число. Как правило, используемая номенклатура, связанная с культивированием клеток и тканей, молекулярной биологией,

иммунологией, микробиологией, генетикой, аналитической химией, синтетической органической химией, медицинской и фармацевтической химией и химией и гибридизацией белков и нуклеиновых кислот, а также соответствующие методики, описанные в данном документе, являются хорошо известными и широко используемыми в данной области техники. Ферментативные реакции и методики очистки выполняются в соответствии с описаниями производителя, как обычно осуществляется в данной области техники или как описано в данном документе. Во всем настоящем описании и вариантах осуществления слова "иметь" и "содержать" или их варианты, такие как "имеет", "имеющий", "содержит" или "содержащий", следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел.

Последовательности, описанные в данном документе, перечислены ниже.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO: 1 (тяжелая цепь Ab1)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFS SNVISWVRQA PGQGLEWMGG
 VIPIVDIANY
 AQRFGKRVTI TADESTSTTY MELSSLRSED TAVYYCASTL GLVLDAMDYW
 GQGTLVTVSS
 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 HTFPAVLQSS
 GLYSLSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDPKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP
 APEFLGGPSV
 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVDVDSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQFNSTY
 RVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPSQEEMTK
 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD DGSFFLYSRL
 TVDKSRWQEG

NVFCSCVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

SEQ ID NO: 2 (легкая цепь Ab1)

ETVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSLG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY
 GASSRAPGIP
 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYADSPITFG QGTRLEIKRT
 VAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK
 DSTYLSSTL

TLKADYEKH KVIACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEK

SEQ ID NO: 3 (тяжелая цепь фрезолиумаба, в том числе лидерная последовательность - остатки 1-19)

MGWSCIILFL VATATGVHSQ VQLVQSGAEV KKPSSSVKVS CKASGYTFSS
 NVISWVRQAP GQGLEWMGGV IPIVDIANYA QRFKGRVTIT ADESTSTYM
 ELSSLRSED AVYYCASTLG
 LVLAMDYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFP LAPCSRSTSES TAALGCLVKD
 YFPEPVTWSW NSGALTSGVH TFPVLQSSG LYSLSVTVTV PSSSLGTKTY
 TCNVDPKPSN TKVDKRVESK
 YGPPCPSCPA PEFLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVDVDSQEDP
 EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 KVSNGKLPSS IEKTISKAKG

QPREPQVYTL PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
 KTPPVLDSD GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSCVMHEA LHNHYTQKSL LSLSLGK

SEQ ID NO: 4 (легкая цепь фрезолиумаба, в том числе лидерная последовательность - остатки 1-19)

MGWSCIILFL VATATGVHSE TVLTQSPGTL SLSPGERATL SCRASQSLGS
 SYLAWYQQKP GQAPRLLIYG ASSRAPGIPD RFSGSGSGTD FTLTISRLEP
 EDFAVYYCQ YADSPITFGQ
 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSK DSTYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEK

SEQ ID NO: 5 (тяжелая цепь Mab к PD-1)

EVQLLES	GGV	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS	NFGMTW	VRQA	PGKGLE	WVSG
ISGGGR	DITYF	ADSVKG	RFTI	SRDNSK	NNTLY	LQMNSL	KGED	TAVYYC	VKWG
NIYFDY	WGQG	TLVTVS	SAST	KGPSVF	PLAP	CSRSTSE	STA	ALGCLV	KDYF
PEPVTV	SWNS	GALTSG	VHTF	PAVLQS	SGLY	SLSSVV	TVPS	SSLG	TKTYTC
NVDIIP	SNTK	VDKRVE	SKYG	PPCP	CPAPE	FLGGPS	VFLF	PPKPKD	TLMI
SRTPEV	TCVV	VDVSQE	DPEV	QFNWYV	DGVE	VHNAKT	KPRE	EQFNST	YRVV
SVLTVL	HQDW	LNGKEY	KCKV	SNKGLP	SSIE	KTISKAK	GQP	REPQVY	TLPP
SQEEMT	KNQV	SLTCLV	KGFY	PSDIAVE	WES	NGQPEN	NYKT	TPPVLD	SDGS

FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK

SEQ ID NO: 6 (легкая цепь Mab к PD-1)

DIQMTQ	SPSS	LSASVG	DSIT	ITCRAS	LSIN	TFLN	WYQQK	PK	GKAPNLLIYA
ASSLHG	GVPS	RFSGSG	SGTD	FTLTIR	TLQP	EDFATY	YCQQ	SSNTPF	TFGP
GTVVDF	RRTV	AAPSVF	FIFPP	SDEQLK	SGTA	SVVCLL	NNFY	PREAKV	QWKV
DNALQS	GSNSQ	ESVTEQ	DSKD	STYSLS	SSTLT	LSKADY	EKHK	VYACEV	THQG

LSSPVTKSFN RGEC

SEQ ID NO: 7 (тяжелая цепь Mab x-anti-mPD-1)

EVQLQES	GGPG	LVKPSQ	SLSL	TCSVTG	YSIT	SSYRWN	WIRK	FPGNRLE	WMG
YINSAG	ISNY	NPSLKR	RISI	TRDTSK	NQFF	LQVNSV	TTE	AATYYC	CARS
NMGTT	PFTY	WG	TLTV	VSS	AKTTP	PPSV	YP	LAPGSA	AQT
GYFPE	PVT	VT	WNSG	SLSS	GV	HTFPA	VLQSD	LYTLSS	SVTV
TCNVA	H	PASS	TKVD	KKIV	PR	DCGCK	PCICT	VPEVSS	VFI
TLTPK	VTC	CV	VDISK	DDPE	V	QFSWF	VDDVE	VHTAQ	TQPRE
SELPIM	HQDW		LNGKE	FKCR	V	NSAAFP	APIE	KTISK	TKGRP
PKEQM	AKDKV		SLTCM	ITDFF		PEDITV	EWQW	NGQPA	ENYKN

YFVYSKLNQV KSNWEAGNTF TCSVLHEGLH NHHTEKSLSH SPG

SEQ ID NO: 8 (легкая цепь Mab x-anti-mPD-1)

DIVMTQ	G	TL	P	NPVPS	G	ESVS	ITCRSS	KSLL	YSDG	KTYL	NW	YLQRP	GQSP	Q
LLIYWM	STRA			SGVSD	R	FSGS	GGTD	F	TLKI			SGVEA	ED	VGI
TFGGG	TKLEL			KRADAA	P	TVS	IFPP	STE	QLA			TGGAS	V	CLM
KWKID	G	TERR		DGVLDS	V	TDQ	DSKD	STYS	MS			STLSL	T	KADY

VHKTSSSPVV KSFNRNEC

SEQ ID NO: 9 (тяжелая цепь 1D11)

HVQLQQ	SGPE	LVRPG	ASVKL	SCKASG	YIFI	TYWMN	WVKQR	PGQGLE	WIGQ
IFPASG	STNY	NEMFEG	KATL	TVDTSS	SSTAY	MQLSSL	TSED	SAVYYC	CARGD

GNALDAMDY WGQGSVTVS

SAKTTP	PSVY	PLAPGS	AQT	NSMVT	LGCLV	KGYF	PEP	TV	TWNSG	SLSSG
--------	------	--------	-----	-------	-------	------	-----	----	-------	-------

VHTFPAVLQS

DLYTL	SSSVT	VPSST	WPSQT	VTCN	VAHPAS	STKVD	KKIVP	RDCG	CKPCIC
-------	-------	-------	-------	------	--------	-------	-------	------	--------

TVPEVSSVFI

FPPKPK	DVLT	ITLTP	KVTCV	VVDISK	DDPE	VQFSW	FDDV	EVHTA	QTKPR
--------	------	-------	-------	--------	------	-------	------	-------	-------

EEQFNSTFRS

VSELPIM	HQD	WLNKE	FKCR	VNSAAF	PAPI	EKTISK	TKGR	PKAPQ	VYTIP
---------	-----	-------	------	--------	------	--------	------	-------	-------

PPKEQMAKDK

VSLTCM	ITDF	FPEDIT	VEWQ	WNGQ	PAENYK	NTQP	IMDTG	SYFVY	SKLN
--------	------	--------	------	------	--------	------	-------	-------	------

QKSNWEAGNT

SEQ ID NO: 10 (легкая цепь 1D11)

NIVLTQ	SPAS	LAVSLG	QRAT	ISCRASE	SVD	SYGNS	FMHWY	QQKSG	QPPKL
--------	------	--------	------	---------	-----	-------	-------	-------	-------

LIYLASNLES

GVPAR	FSGSG	SRTDFT	LTID	PVEADDA	ATY	YCQQN	NEDPL	TFGAG	TKLEL
-------	-------	--------	------	---------	-----	-------	-------	-------	-------

KRADAAPTVS

IFPPS	SEQLT	SGGAS	VVCFL	NNFY	PKDINV	KWKID	G	SERQ	NGVLN
-------	-------	-------	-------	------	--------	-------	---	------	-------

DSKDSTYSMS

STLTLTKDEY ERHNSYTCEA THKTSTSPIV KSFNRNEC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело, которое специфично связывается с TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3 человека, содержащее
 - определяющие комплементарность области (CDR) 1-3 тяжелой цепи, содержащие последовательности SNVIS, GVIPIVDIANYAQRFGK и TLGLVLDAMDY соответственно; и
 - CDR1-3 легкой цепи, содержащие последовательности RASQSLGSSYLA, GASSRAP и QQYADSPIT соответственно,
 - где антитело содержит константную область IgG₄ человека, содержащую пролин в положении 228 (нумерация по EU).
2. Антитело по п.1, где антитело содержит
 - аминокислотную последовательность варибельного домена тяжелой цепи (V_H), соответствующую остаткам 1-120 SEQ ID NO: 1; и
 - аминокислотную последовательность варибельного домена легкой цепи (V_L), соответствующую остаткам 1-108 SEQ ID NO: 2.
3. Антитело по п.2, где антитело содержит
 - аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 1; и
 - аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 2.
4. Применение анти-TGF- β антитела по любому из пп.1-3 для производства лекарственного препарата, предназначенного для ингибирования передачи сигнала от TGF- β у пациента.
5. Применение по п.4, где пациент страдает солидным раком.
6. Применение анти-TGF- β антитела по любому из пп.1-3 для производства лекарственного препарата, предназначенного для лечения рака у пациента в комбинации с ингибитором белка контрольной точки иммунного ответа, где белок контрольной точки иммунного ответа представляет собой PD-1, PD-L1 или PD-L2 и рак представляет собой солидную опухоль мезенхимального подтипа.
7. Применение по п.6, где ингибитор белка контрольной точки иммунного ответа представляет собой анти-PD-1 или анти-PD-L1 антитело.
8. Применение по п.6 или 7, где рак является невосприимчивым к лечению анти-PD-1 или анти-PD-L1 антителом.
9. Применение по любому из пп.6-8, где рак характеризуется сверхэкспрессией одного или нескольких из ACTA2, VIM, MGP и ZWINT.
10. Применение по любому из пп.6-9, где рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легкого, немелкоклеточного рака легких, плоскоклеточной карциномы кожи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, уротелиального рака и почечноклеточной карциномы.
11. Применение по п.10, где рак представляет собой меланому на поздней стадии, или метастатическую меланому, или плоскоклеточную карциному кожи.
12. Применение по любому из пп.6-11, где анти-TGF- β антитело ослабляет иммунодепрессивное микроокружение опухоли.
13. Применение анти-TGF- β антитела по любому из пп.1-3 для применения в производстве лекарственного препарата для повышения иммунного ответа у пациента в комбинации с анти-PD-1 или анти-PD-L1 антителом.
14. Применение по любому из пп.8-13, где анти-TGF- β антитело и анти-PD-1 или анти-PD-L1 антитело вводят пациенту в один и тот же день.
15. Применение по любому из пп.8-14, где анти-TGF- β антитело и анти-PD-1 или анти-PD-L1 антитело вводят пациенту раз в две недели или каждые три недели.
16. Применение по любому из пп.8-15, где анти-TGF- β антитело содержит
 - a) HCDR1-3, содержащие последовательности GFTFSNFG, ISGGGRDT и VKWGNIFYFDY соответственно, и LCDR1-3, содержащие последовательности LSINTF, AAS и QQSSNTPFT соответственно;
 - b) аминокислотную последовательность V_H, соответствующую остаткам 1-117 SEQ ID NO: 5, и аминокислотную последовательность V_L, соответствующую остаткам 1-107 SEQ ID NO: 6; или
 - c) аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 6.
17. Применение по любому из пп.4-16, где антитело к TGF- β содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 2.
18. Способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества выделенного моноклонального антитела по п.1 и терапевтически эффективного количества анти-PD-1 или анти-PD-L1 антитела, где рак представляет собой солидную опухоль мезенхимального подтипа.
19. Способ по п.18, где анти-PD-1 антитело содержит

а) CDR1-3, содержащие последовательности GFTFSNFG, ISGGGRDT и VKWGNIYFDY соответственно, и CDR1-3, содержащие последовательности LSINTF, AAS и QQSSNTPFT соответственно;

б) аминокислотную последовательность V_H , соответствующую остаткам 1-117 SEQ ID NO: 5, и аминокислотную последовательность V_L , соответствующую остаткам 1-107 SEQ ID NO: 6; или

в) аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 6.

20. Способ по п.18 или 19, где анти-PD-1 или анти-PD-L1 антитело представляет собой анти-PD-1 антитело, содержащее аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 6.

21. Способ по любому из пп.18-20, где выделенное моноклональное антитело содержит аминокислотную последовательность варибельного домена тяжелой цепи (V_H), соответствующую остаткам 1-120 SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность варибельного домена легкой цепи (V_L), соответствующую остаткам 1-108 SEQ ID NO: 2.

22. Способ по п.21, где выделенное моноклональное антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 2.

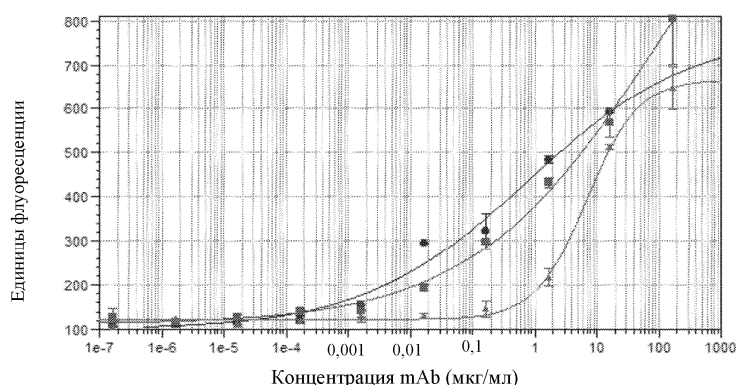
23. Способ по любому из пп.18-22, где рак является невосприимчивым к лечению анти-PD-1 или анти-PD-L1 антителом.

24. Способ по любому из пп.18-23, где рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легкого, немелкоклеточного рака легких, плоскоклеточной карциномы кожи, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, уротелиального рака и почечноклеточной карциномы.

25. Способ по любому из пп.18-24, где выделенное моноклональное антитело и анти-PD-1 или анти-PD-L1 антитело вводят в дозе 0,05-40 мг/кг массы тела соответственно.

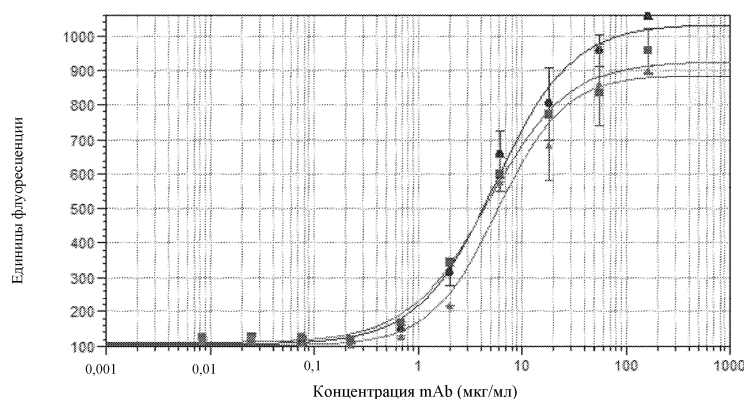
26. Способ по п.25, где выделенное моноклональное антитело и анти-PD-1 или анти-PD-L1 антитело вводят в дозе 15 или 20 мг/кг массы тела соответственно.

TGF- β 1 человека ■ Ab1 ● Фрезолимумаб ▲ 1D11 (мышинный имитатор)

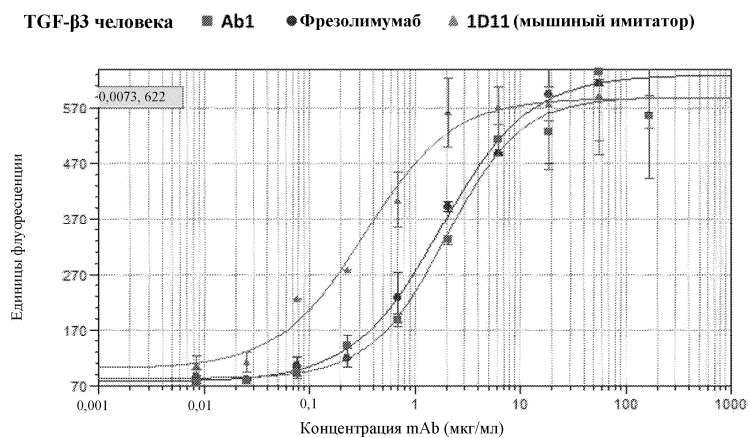


Фиг. 1А

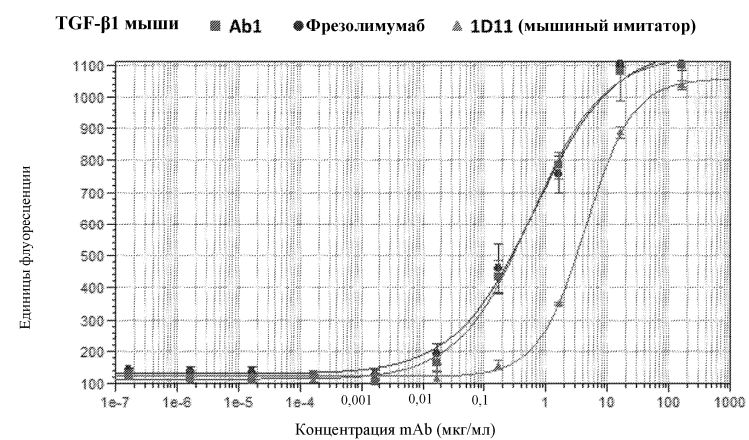
TGF- β 2 человека ■ Ab1 ● Фрезолимумаб ▲ 1D11 (мышинный имитатор)



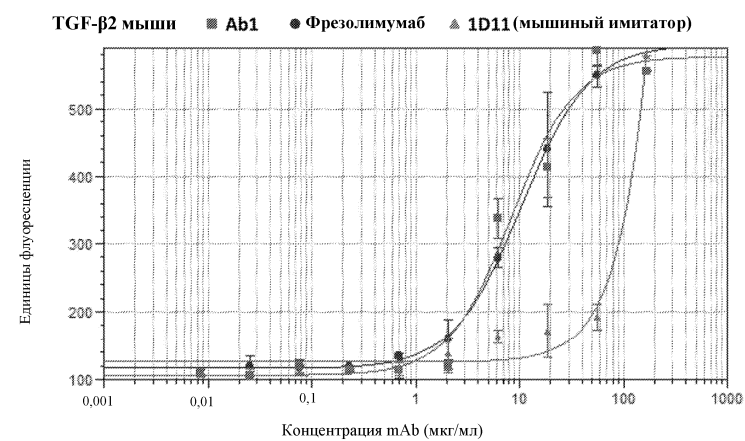
Фиг. 1В



Фиг. 1С

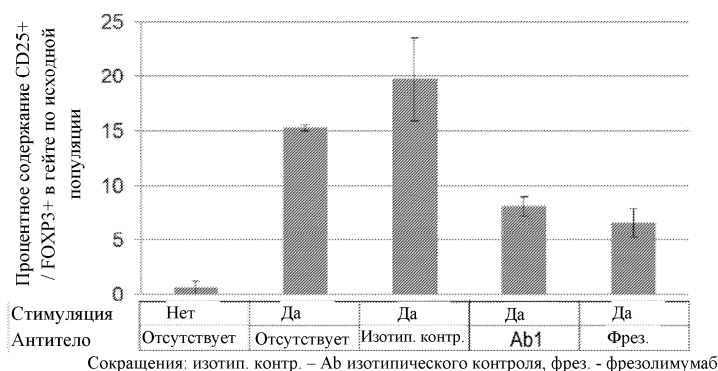


Фиг. 1D



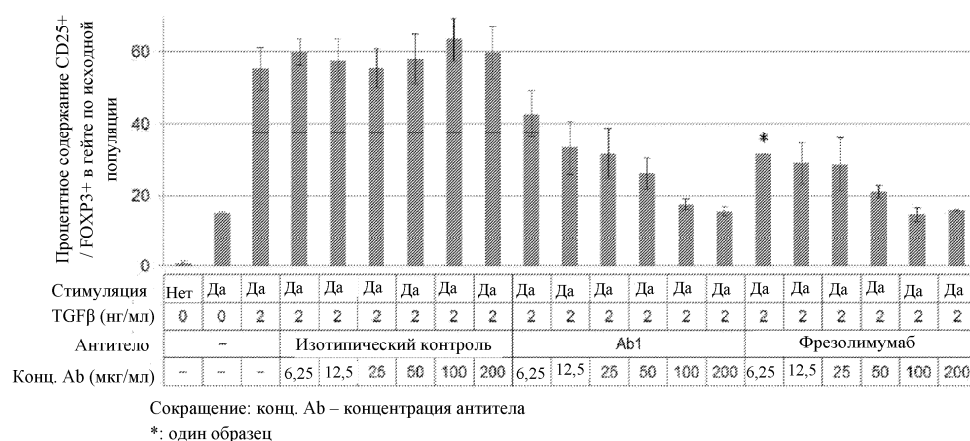
Фиг. 1Е

Эффект 50 мкг/мл Ab1 в отношении дифференцировки в индуцируемые регуляторные Т-клетки человека



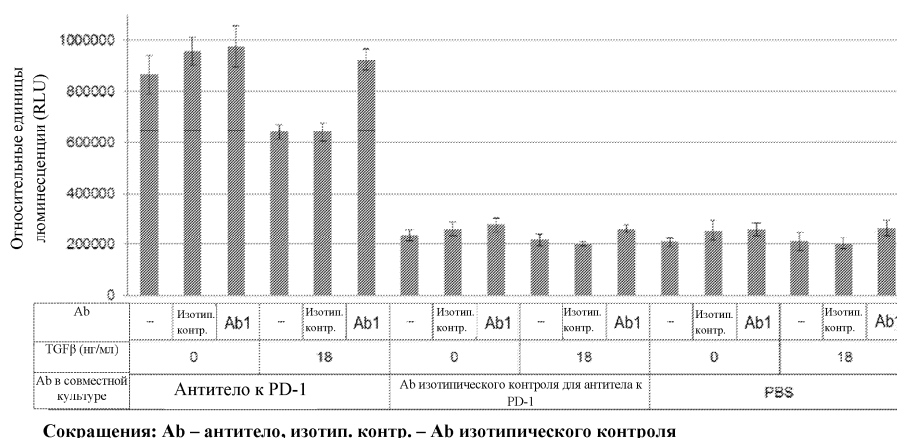
Фиг. 2

Эффект Ab1 в отношении дифференцировки в индуцируемые регуляторные Т-клетки человека в культурах, обработанных с помощью 2 нг/мл TGF-β1



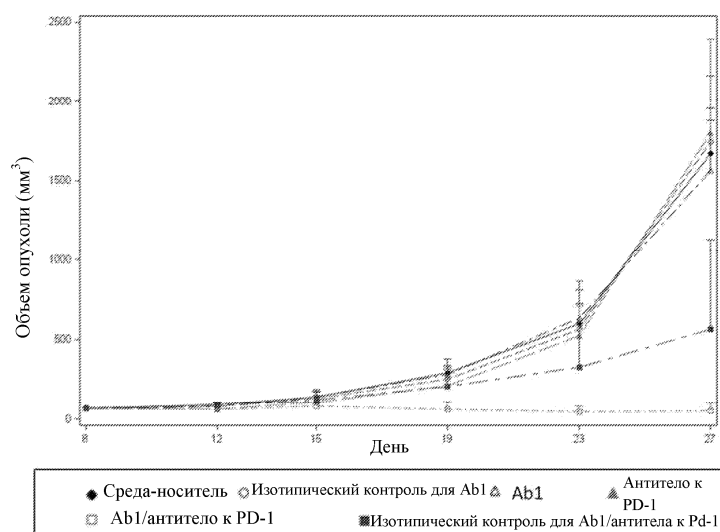
Фиг. 3

Эффект Ab1 (30 мкг/мл) и TGF-β1 (18 нг/мл) в отношении экспрессии люциферазы, управляемой NFATc, в Т-клетках Jurkat после стимуляции Т-клеток и обработки антителами к PD-1



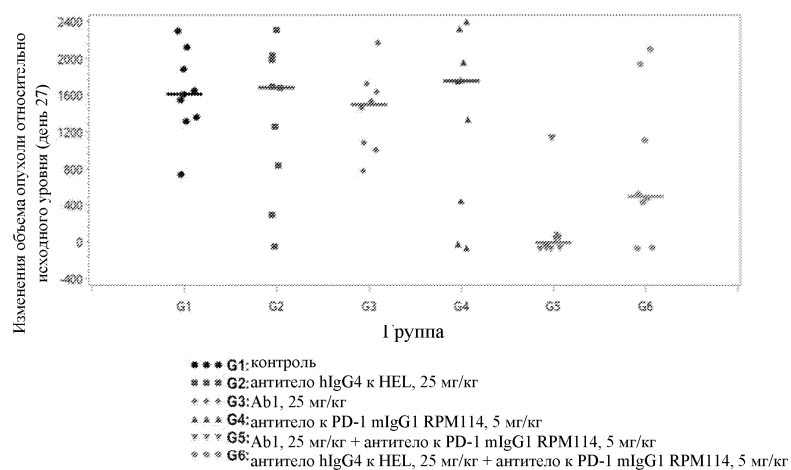
Фиг. 4

Объем опухоли (мм³) по группам обработки – медианные значения и MAD



Фиг. 5

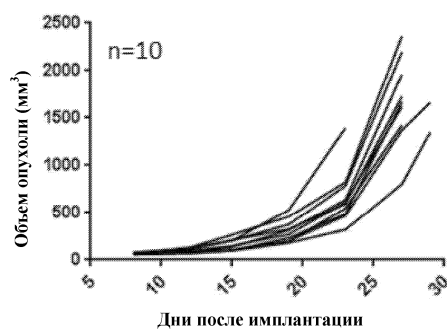
Изменения объема опухоли относительно исходного уровня в день 27



* Точки представляют индивидуальные изменения объема опухоли относительно исходного уровня в день 27, горизонтальные линии соответствуют медианным значениям.

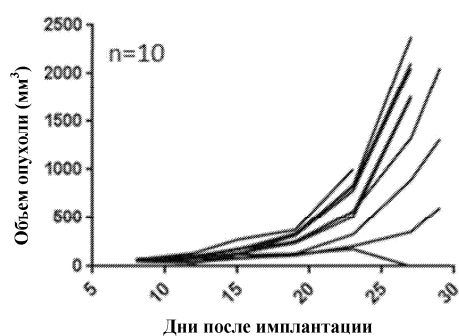
Фиг. 6

PBS



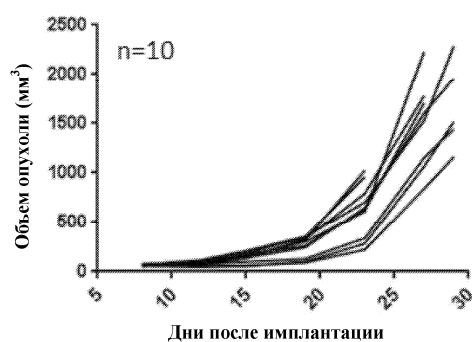
Фиг. 7А

Изотипический контроль для Ab1 (25 мг/кг)

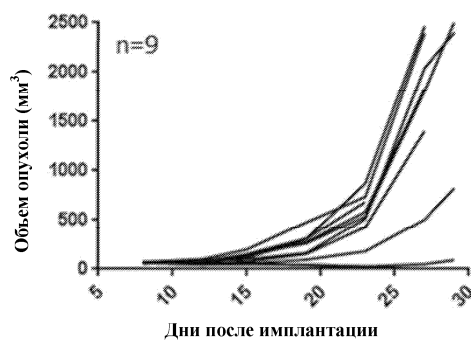


Фиг. 7В

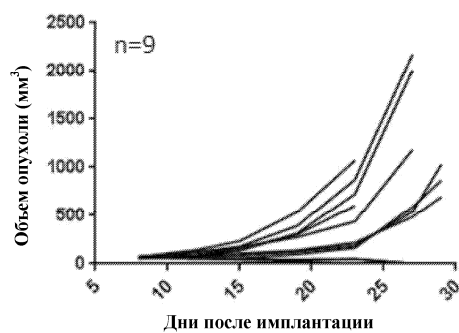
Ab1 (25 мг/кг)



Фиг. 7С

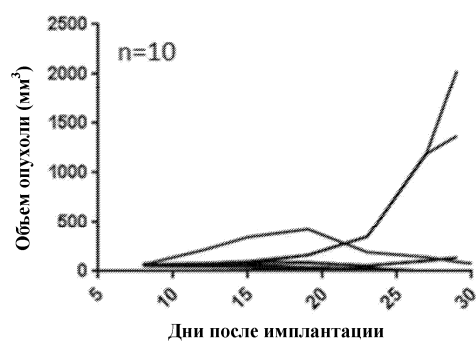
 α PD1 (5 мг/кг)

Фиг. 7D

Изотипический контроль для Ab1 (25 мг/кг)/ α PD1 (5 мг/кг)

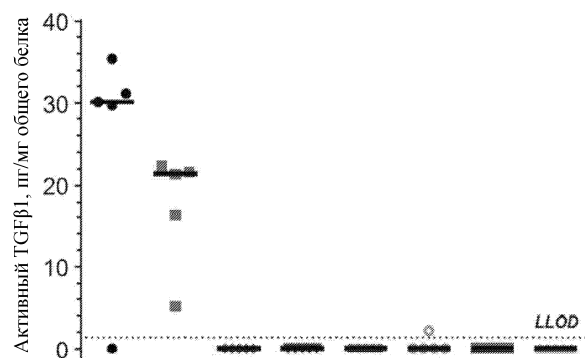
Фиг. 7Е

Ab1 (25 мг/кг)/αPD1 (5 мг/кг)



Фиг. 7F

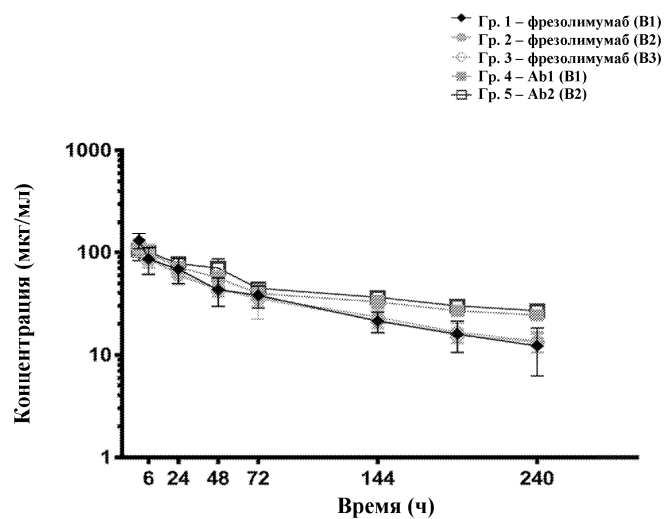
Эффекты Ab1 в отношении концентрации активного
TGF-β1 в лизатах опухолей из LoVo



Концентрация, мг/кг		50	10	25	50	10	25	50
Обработка	PBS	Изотип. контроль	Ab1			Фрезолимумаб		

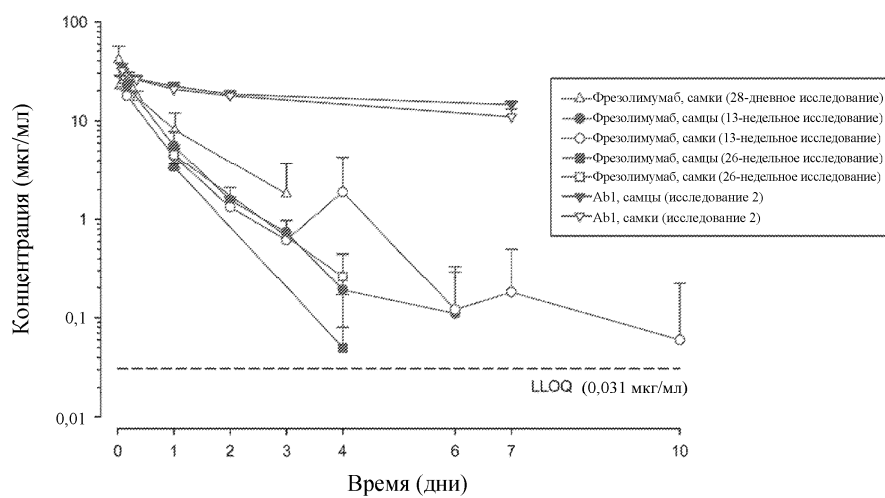
Фиг. 8

Крысы – однократная доза 5 мг/кг



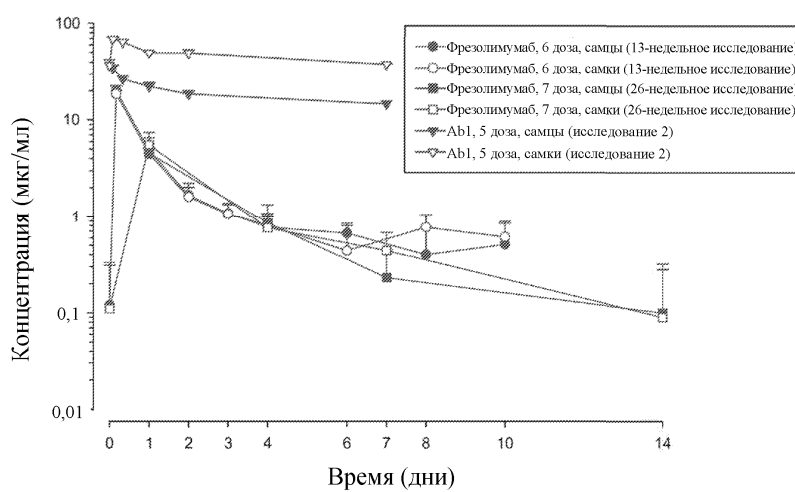
Фиг. 9А

Обезьяны – однократная доза 1 мг/кг



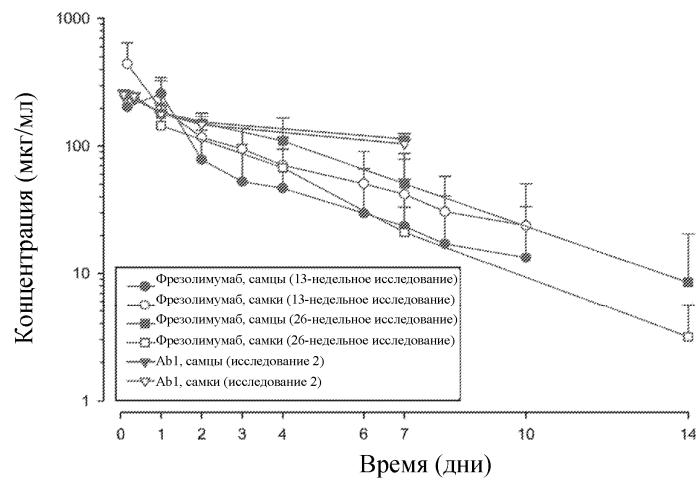
Фиг. 9В

Обезьяны – повторная доза 1 мг/кг



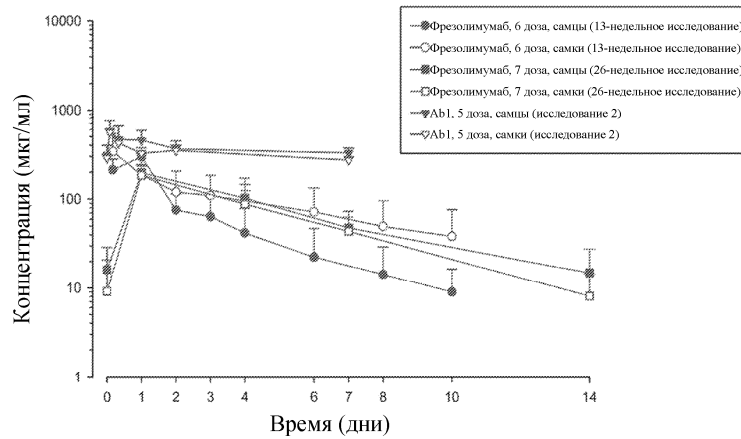
Фиг. 9С

Обезьяны – однократная доза 10 мг/кг



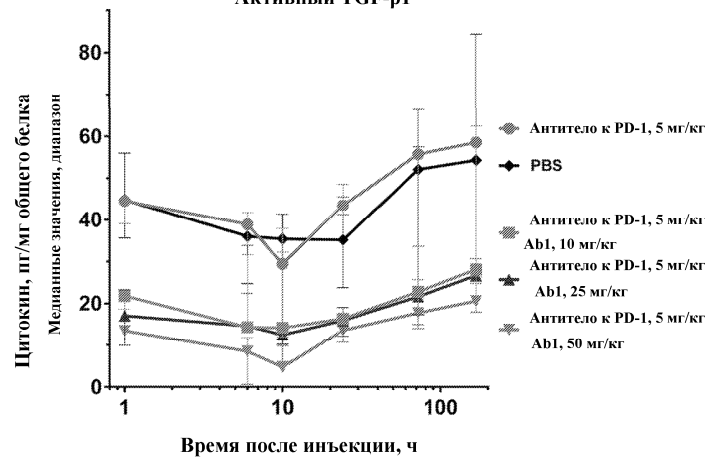
Фиг. 9D

Обезьяны – повторная доза 10 мг/кг



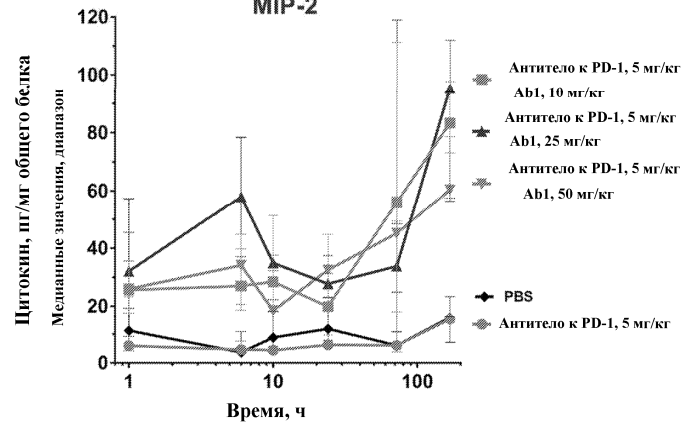
Фиг. 9Е

Активный TGF-β1

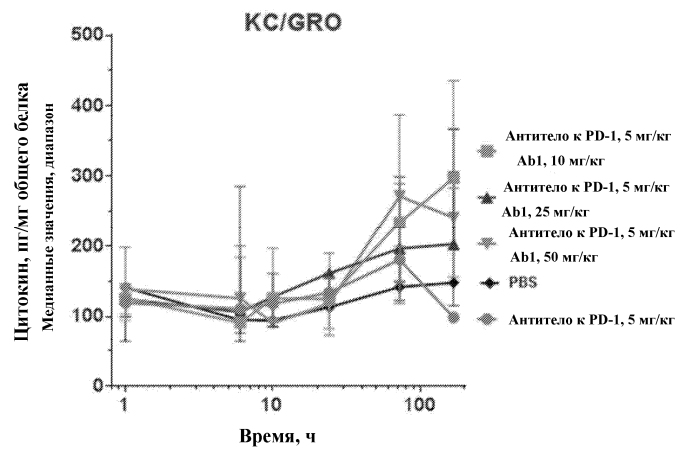


Фиг. 10А

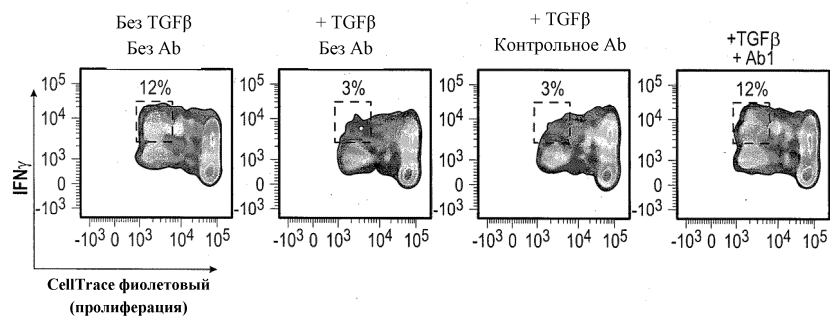
MIP-2



Фиг. 10В

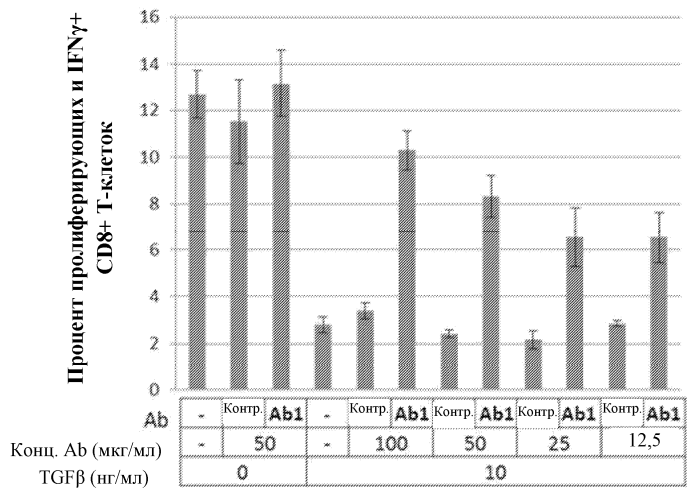


Фиг. 10С

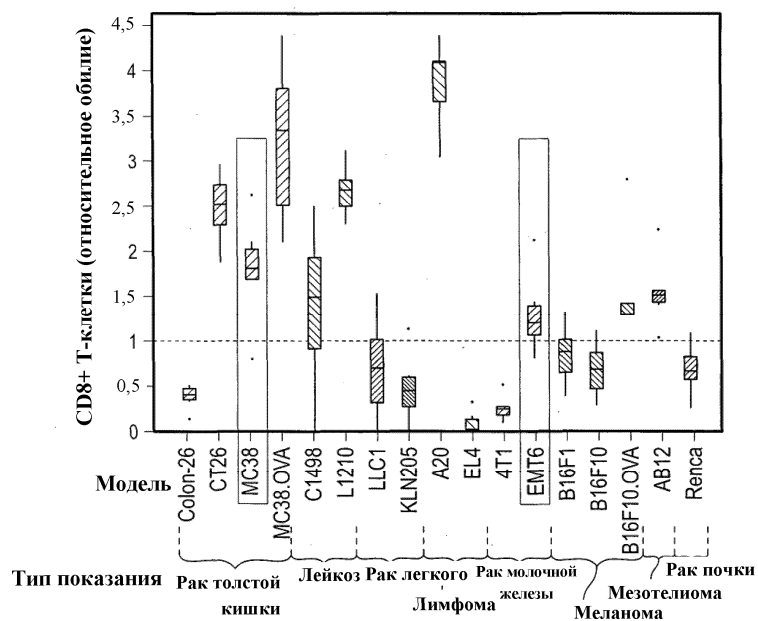


Фиг. 11А

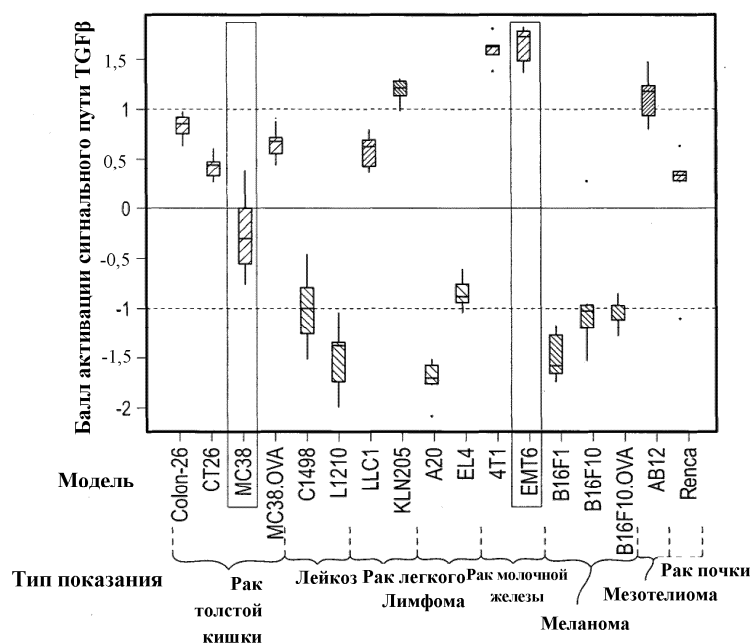
Донор 1



Фиг. 11В



Фиг. 12А



Фиг. 12В

